

Aminas Aromáticas Heterocíclicas em sardinha e salmão grelhados: Influência do processamento culinário

Dissertação apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto para obtenção do grau de Mestre em Controlo de Qualidade na Especialidade Água e Alimentos

Trabalho realizado no Laboratório
de Bromatologia da Faculdade de
Farmácia da Universidade do
Porto

Sob orientação de:

Prof^a Doutora Isabel Maria Pinto Leite Viegas Oliveira Ferreira

Co-orientação de

Prof^a Doutora Olívia Maria de Castro Pinho

Resumo

O consumo de peixe permite a ingestão de proteínas de elevado valor biológico, ácidos gordos ómega 3, vitaminas e certos minerais. No entanto, os processos culinários, principalmente os que envolvem calor, podem ocasionar modificações indesejáveis, tais como, perda de valor nutricional e formação de compostos nocivos. Grelhar em carvão é um método frequentemente usado na preparação de peixes gordos, em que, facilmente se atingem temperaturas elevadas, podendo ocorrer a formação de aminas aromáticas heterocíclicas (AAHs), que são mutagénicas e carcinogénicas. A temperatura de cocção tem influência no tipo de AAHs formadas: a temperaturas moderadas, entre os 150°C e os 250°C, formam-se, preferencialmente, aminas térmicas, enquanto que, a temperaturas superiores, geralmente acima dos 300°C, formam-se, predominantemente, aminas pirolíticas.

Neste trabalho avaliou-se a formação de AAHs, durante a grelha em carvão, de dois tipos de peixe gordo: sardinhas (*Sardina Pilchardus*) e salmão do Atlântico (*Salmo salar*). As amostras em estudo foram grelhadas em diferentes condições de tempo e temperatura. A composição em AAHs das amostras de peixe foi avaliada por HPLC/Fluorescência/Díodos, após extracção e purificação adequada. Adicionalmente, avaliou-se a influência de diferentes fontes de calor - carvão e resistência eléctrica - na formação de AAHs, em salmão grelhado.

O grau de cocção influenciou significativamente a formação de AAHs nas sardinhas grelhadas. Assim, nas amostras mal passadas não se detectaram AAHs, ao contrário do que se verificou nas amostras bem passadas, em que os teores de aminas térmicas, MeIQx, IQ e PhIP, foram, respectivamente, 2,2; 0,9 e 6,5 ng/g, e de aminas pirolíticas, Trp-P-1, Trp-P-2, A α C e MeA α C, foram, respectivamente, 1,8; 8,2; 17,7 e 10,6 ng/g. Para um grau de cocção médio, a detecção e quantificação de AAHs só se verificou nas amostras grelhadas próximas da fonte de calor.

O salmão grelhado bem passado apresentou um perfil de AAHs diferente do perfil das sardinhas grelhadas. A temperatura e a proximidade à fonte de calor foram um factor determinante na quantidade, mas não na qualidade de AAHs formadas. Os teores mais elevados de AAHs foram observados no salmão grelhado na brasa, próximo da fonte de calor (300°C), onde se verificaram valores de 2,25; 0,35 e 13,0 ng/g para aminas térmicas, Glu-P-1, MeIQx e PhIP, respectivamente, e valores de 3,5 e 0,8 ng/g para as aminas pirolíticas, A α C e MeA α C, respectivamente.

Abstract

The consumption of fish provides intake of proteins of high biological value, omega-3 fatty acids, vitamins and certain minerals. However, fish cooking and heat treatment can lead to undesirable modifications, such as the loss of nutritional values and formation of toxic compounds. Grilling and barbecuing are the most common methods for preparation of fatty fishes and, usually, require high temperatures of cooking, thus mutagenic and carcinogenic heterocyclic aromatic amines (AAHs) are sometimes formed. The achieved temperature influence the kind of AAHs formed: at moderate temperatures, between 150 and 250°C, “Thermic AAHs” are usually formed, while, at higher temperatures, in general above 300°C, the “pyrolytic AAHs” are formed preferably.

In this work, the formation of AAHs during barbecuing of two types of fatty fishes - sardines (*Sardina Pilchardus*) and Atlantic salmon (*Salmo salar*) was evaluated. Samples were submitted to different grilling conditions, time and temperature. AAHs contents of fish samples were evaluated by HPLC/Fluorescence/Diodes, after appropriate extraction and purification. Additionally, the influence of two different kinds of heat was evaluated.— charcoal live coals and electrical heat - on formation of AAHs in grilled salmon

Cooking donness influenced significantly the formation of AAHs in grilled sardines. No AAHs were detected in “rare” samples, but these compounds were quantified in “well done” sardines, where the levels of thermic AAHs, MeIQx, IQ and PhIP were respectively 2.2, 0.9 and 6.5 ng/g and the levels of pyrolytic amines Trp-P-1, Trp-P-2, A α C and MeA α C were respectively 1.8, 8.2, 17.7 and 10.6 ng/g.

“Well done” grilled salmon, presented a pattern of AAHs different from those of “well done” grilled sardines. The temperature and proximity to the heat source were relevant to the levels of AAHs but not affected the type of amines. Higher levels were quantified in salmon grilled near the charcoal (300°C) presenting 2.25, 0.35 and 13.0 ng/g for thermic amines, respectively Glu-P-1, MeIQx and PhIP and 3.5 and 0.8 ng/g for the pyrolytic amines, respectively, A α C and MeA α C.

No significant differences were observed on the levels of AAHs in salmon grilled far from charcoal (200°C) and in salmon grilled on electrical grid at similar temperature.

Trabalhos desenvolvidos no decurso da preparação desta dissertação:
Publicações e Comunicações.

Publicações:

M. Costa, A. Melo, I.M.P.L.V.O. Ferreira, O. Pinho "Formation of heterocyclic aromatic amines in grilled meat and fish", (2008), Culinary Arts and Sciences VI (ISBN: 82-7644-294-3), 405 - 408.

M. Costa, O. Viegas, A. Melo, C. Petisca, O. Pinho, I.M.P.L.V.O. Ferreira "Heterocyclic Aromatic Amine Content in Grilled Fish to Varying Degrees of Doneness and Grilling Conditions" (Submetido ao Journal of Agricultural and Food Chemistry)

Comunicações:

M. Costa, A. Melo, C. Petisca, I.M.P.L.V.O. Ferreira, O. Pinho. "Formation of heterocyclic aromatic amines in charcoal grilled sardines" No IJUP08, First Meeting of Young Researchers of U.Porto, Porto, 20 - 22 de Fevereiro, 2008.

A. Melo, M. Costa, R. Eça, I.M.P.L.V.O. Ferreira, O. Pinho. "Influence of beer antioxidative properties on the formation of the heterocyclic amine PhIP in grilled beef" No IJUP08, First Meeting of Young Researchers of U.Porto, Porto, 20 - 22 de Fevereiro, 2008.

Este trabalho foi realizado no âmbito do projecto de Investigação RIC IPG 156/07: Interação entre AAHs e antioxidantes: um desafio para a segurança alimentar.

<https://www.fcna.up.pt/projectoPreGraduacao>

Agradecimentos

Durante a realização deste mestrado tive a oportunidade de fazer a minha primeira incursão pelo mundo da investigação científica. Ao longo deste período, percebi que, mais do que “mentes iluminadas” e rasgos de genialidade, a ciência exige, sobretudo, trabalho, persistência, obstinação e dedicação. Por isso, quero agradecer o valioso contributo que a Sr^a Professora Doutora Isabel Ferreira e a Sr^a Professora Doutora Olívia Pinho prestam à comunidade científica, inculcando nos seus alunos o gosto e vontade de fazer ciência.

Agradeço, também, aos colegas e amigos que trabalham no Laboratório de Bromatologia de Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, pelo exemplo de companheirismo e espírito de equipa que sempre demonstraram.

Abreviaturas

AAH	Amina Aromática Heterocíclica
AαC	2-Aminopyrido [2,3-b] indole
APCI	Ionização Química a Pressão Atmosférica
API	Ionização a Pressão Atmosférica
ATP	Trifosfato de adenosina
BHA	Butil-hidroxianisol
BHT	Butil-hidroxitolueno
CE	Electroforese capilar
CYP1A1	Citocromo P450, família 1A1
CYP1A2	Citocromo P450, família 1A2
DAD	“Diode Array Detection”
DAO	Diaminooxidase
dG-C8-	“N ² -(2'-Deoxyguanosin-8-yl)”
DiMeIQx	Dimetilaminoquinoxaline
DCM	Diclorometano
DMIP	2-amino-1,6-dimethylimidazol[4,5-b]pyridine
DNA	Ácido desoxirribonucleíco
ED	Deteccção Electroquímica
ELSD	“Evaporative Light Scattering Detector”
ELISA	Ensaio imunoenzimático -“Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay”
ESI	Ionização por Electrospray
-FLD	Deteccção por Ionização em Chama
GC	Cromatografia gasosa
GST	Glutathione -S-transferase
Glu-P-	aminometildipiridoimidazol
HDL	Colesterol de alta densidade
HPLC	Cromatografia líquida de alta performance
HS-SPME	Microextracção em fase sólida no espaço de cabeça
IFP	2-Amino-1,6-dimethylfuro [3,2-e]imidazo [4,5-b] pirydine
IQ	2-Amino-3-metil-imidazo[4,5-f]quinolina
IQx	2-Amino-3-methylimidazo [4,5-f]quinoxaline
LC	Cromatografia líquida
LDL	Colesterol de baixa densidade
LLE	Extracção líquido-líquido
Lys-P-1	3,4-ciclopentenopyridine [3,2-a] carbazole
MAO	Monoaminooxidase

MeA α C	2-Amino-3-methyl-9H-pyrido [2,3-b] indole
MeIQ	2-Amino-3,4-dimethyl-imidazo[4,5-f]quinoline
MeIQx	2-Amino-3,8-dimethyl-imidazo[4,5-f]quinoxaline
MS	Espectrometria de massa
NAT	N-acetiltransferase
NDEA	Nitrosodietilamina
NDMA	Nitrosodimetilamina
NPIP	Nitrosopiperidina
NPIR	Nitrosopiperidina
Orn-P-1	Aminomethyltetraazafluoranteno
PAHs	Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos
Phe-P-1	2-amino-5-fenilpyridine
PhIP	2-Amino-1-methyl-6-fenilimidazo[4,5-b]piridine
SIM	Monitorização por ião selectivo
SPE	Extracção em fase sólida
SULT	Sulfotransferase
TEA	Detector de quimiluminescência
Trp-P-	Aminodimethylpyridoindole
TriMeIQx	Trimethylaminoquinoxaline
TRPA	Tryptophan Amadori Rearrangement Product
UV	Ultra violeta
Vis	Visível

Introdução geral e objectivos do trabalho.....	1
Objectivos.....	5
I-Parte teórica.....	6
1. Valor nutricional dos peixes gordos - sardinha e salmão.....	6
1.1.Importância do consumo de peixes gordos- benefícios e riscos	10
1.2.Níveis de consumo de peixe em Portugal.....	12
2. Aminas Aromáticas Heterocíclicas (AAHs).....	13
2.1.Nomenclatura.....	16
2.2.Formação das AAHs	17
2.3.Sistemas Modelo.....	20
2.4.Factores que afectam a formação as AAHs.....	23
2.5.Níveis de concentração das AAHs nos alimentos.....	28
2.6.Metabolismo/ Toxicidade das AAHs.....	30
2.7.Mutagénese	32
2.8.Carcinogénese	35
2.9.Exposição/avaliação dos riscos	37
2.10.Metodologias analíticas para identificação e quantificação de AAHs em alimentos.....	40
II-Parte experimental	44
1. Materiais e Métodos	44
1.1.Reagentes.....	44
1.2.Equipamento	45
1.3. Amostras.....	45
1.4. Condições de grelha	46
1.5.Extracção e purificação	47
1.6.Condições cromatográficas.....	49
1.7.Identificação e quantificação das AAHs	50
1.8.Análise estatística	52
2. Resultados e Discussão	52
2.1.Quantificação das AAHs em peixe grelhado: Validação do método analítico.....	52
2.2.Quantificação das AAHs em sardinha grelhada.....	57
2.3.Quantificação das AAHs em salmão grelhado	66
2.4.Avaliação da ingestão de AAHs numa refeição	76
3. Conclusões	79
4. Bibliografia	82

Introdução geral e objectivos do trabalho

O peixe é um alimento que deve fazer parte de uma dieta alimentar saudável pois constitui uma importante fonte de **proteínas**, de elevado valor nutritivo e de vários aminoácidos essenciais. Além disso, os peixes gordos, como o salmão e a sardinha, apresentam ácidos gordos insaturados, predominantemente os **ómega-3**, que são benéficos para a saúde cardiovascular. Estas gorduras ajudam a baixar os níveis de colesterol LDL (“mau colesterol”), a elevar os níveis de colesterol HDL (“bom colesterol”) e intervêm na tensão arterial, na coagulação sanguínea, na função dos vasos sanguíneos, na pulsação cardíaca, na resposta imune e nas reacções inflamatórias. Assim, os ácidos gordos poliinsaturados ajudam a diminuir o risco de doença cardiovascular, hipertensão e aterosclerose. Existem 2 tipos principais de ómega 3 provenientes do peixe gordo – o eicosapentanoico (EPA) e o docosahexanoico (DHA).

Os peixes, de um modo geral, apresentam também micronutrientes fundamentais ao nosso organismo. A **vitamina B12** é importante para o crescimento e divisão das células e, em conjunto com o ácido fólico, ajuda na formação de glóbulos vermelhos. O **ferro**, por se apresentar na forma “heme”, tem uma elevada disponibilidade e é importante para a formação dos glóbulos vermelhos, transporte do oxigénio no sangue e produção de componentes essenciais, como hormonas e colagénio. O **zinco** é benéfico para o sistema imunitário e função reprodutiva e participa no metabolismo de inúmeros componentes no organismo.

Os peixes são também uma boa fonte de **vitamina B6 e B12** que mantêm os níveis de homocisteína baixos. Este aspecto é importante porque a homocisteína é uma molécula que pode danificar os vasos sanguíneos e cujos elevados níveis no sangue estão associados a um maior risco de doença cardiovascular.

O elevado teor em nutrientes antioxidantes, como o **selénio e as vitaminas A e E**, faz do peixe um alimento importante na prevenção de várias doenças (doença cardiovascular, cancro, diabetes, etc.). Além disso, o selénio,

em conjunto com o iodo, contribui para o normal funcionamento da glândula tireóide, ajudando na regulação da produção de hormona T3.

Os teores de **fósforo**, presentes no peixe, ajudam a formar e a manter os ossos e os dentes saudáveis, em conjunto com o cálcio. O fósforo é essencial para a libertação de energia nas células, para a absorção e transporte de muitos nutrientes e regula também a actividade das proteínas.

O **magnésio** é outro importante micronutriente, presente no peixe, por desempenhar funções a nível da transmissão neuromuscular, participa na regulação dos fluxos através das membranas celulares, coadjuva a actividade de algumas enzimas em variados processos enzimáticos, e está envolvido na replicação de DNA.

A cocção dos peixes possibilita a sua transformação por forma a tornarem-se comestíveis, saborosos e de fácil digestão, proporcionando maior prazer. Além dos aspectos relacionados com a melhoria das características organolépticas e sensoriais dos alimentos, o processamento alimentar permite a eliminação de microorganismos responsáveis por infecções e intoxicações alimentares.

Os métodos culinários diferem entre si, basicamente, pela forma como o calor chega ao alimento. Assim, num alimento **cozido**, o calor chega através do vapor ou do líquido de cozedura. Ao alimento submetido à **fritura**, o calor chega através da gordura, ocorrendo um processo de troca – o alimento perde água e ganha gordura. A maior ou menor penetração de gordura depende do teor de água e volume do alimento, da temperatura de confecção e do tipo de gordura utilizada. No **estufado e guisado**, os meios de transmissão do calor são a água e a gordura em que o alimento é cozinhado em lume brando. Quando **grelhado**, o alimento é submetido directamente ao calor que irradia debaixo deste. O meio de transmissão de calor é o próprio ar e ocorre a libertação de gordura e água durante o processamento. Quando **assado no forno**, o alimento é submetido ao calor (de forma indirecta) que se distribui por convecção do ar aquecido. Além do ar, também a gordura é um meio de transmissão do calor, entre os alimentos assados. Este método culinário permite a manutenção dos sucos internos.

Os diferentes métodos culinários apresentam também diferenças no que respeita às temperaturas de cocção, assim, enquanto a fritura não deve

ultrapassar os 180°C, os assados realizam-se à volta dos 200°C e os grelhados podem ultrapassar os 300°C, principalmente quando realizados na brasa.

Independentemente do método culinário, é objectivo da culinária saudável minimizar as perdas nutritivas e evitar a formação de substâncias tóxicas que ponham em risco a saúde do consumidor. De uma maneira geral, os nutricionistas sugerem, preferencialmente, os cozidos e os grelhados para prática de uma alimentação saudável, uma vez que, não implicam a adição de gordura, reduzindo a ingestão da mesma. No entanto, no que respeita aos grelhados nem todos são saudáveis. Na grelha a carvão, por exemplo, as substâncias resultantes da própria combustão são maioritariamente tóxicas, além disso, a gordura que se liberta durante a grelha cai sobre a fonte de calor e origina, frequentemente, uma chama que carboniza o alimento. Sempre que a matéria orgânica se carboniza formam-se substâncias cancerígenas como sejam os benzo(a)pirenos, entre outras.

Outro aspecto preocupante tem a ver com as elevadas temperaturas a que se realizam a maioria dos grelhados. Além da perda de nutrientes, temperaturas acima dos 300°C conduzem à formação de substâncias com potencial mutagénico elevado como é o caso das substâncias que são alvo de estudo neste trabalho – as aminas aromáticas heterocíclicas (AAHs). Estas substâncias apresentam uma estrutura heterocíclica constituída por carbono, hidrogénio e azoto e formam-se durante o processamento térmico de alimentos, normalmente, proteicos, como carne e peixe. Parecem ter origem em compostos como aminoácidos, glucose, creatina e dipeptidos onde ocorrem, essencialmente, reacções de Maillard entre grupos carbonilo e amina (Nunes e Baptista, 2001). A creatina, à semelhança dos aminoácidos, encontra-se em maior quantidade nos músculos que noutros tecidos, pois que, na forma fosforilada intervem na formação de ATP, necessário à contracção muscular.

Apesar de estar perfeitamente demonstrado que, quando administradas oralmente e de forma continuada, são carcinogénicas (Augustsson *et al.*, 1999), observando-se este efeito em órgãos do ratinho, rato e macaco, a avaliação do risco das AAHs para o Homem tem-se revelado muito difícil. Nos estudos praticados em animais, as doses administradas são, em geral, mil vezes superiores ao conteúdo de tais substâncias na alimentação

humana. Todavia, a espécie humana encontra-se exposta a indutores enzimáticos e a promotores tumorais que podem ter efeito de potenciação sobre a acção mutagénica e carcinogénica dos alimentos que apresentem estas substâncias.

A formação das AAHs ocorre essencialmente em carne e peixe grelhados dependendo para isso das condições de temperatura, pH, concentração de precursores e tipo de aminoácidos presentes. Em geral, quanto maior a temperatura e o tempo de preparação maior a sua produção.

Os primeiros trabalhos relacionados com a descoberta das AAHs ocorreram há trinta anos, quando Nagao e colegas sugeriram (Nagao *et al.*, 1977), partindo do princípio que o fumo do tabaco era cancerígeno, a possibilidade do fumo, produzido durante a grelha do peixe e da carne, ser também cancerígeno. Apesar das evidências científicas nesta área, ainda não foram estabelecidos limites para a presença destas substâncias em alimentos cozinhados. No entanto, o crescente interesse da comunidade científica pelo estudo das AAHs suscitou não só a atenção das entidades reguladoras da saúde como também dos próprios consumidores, interessados em manter um estilo de vida saudável que lhes possibilite qualidade de vida e longevidade.

Muitos trabalhos têm sido publicados no que respeita aos teores de AAHs em carnes cozinhadas (Toribio *et al.*, 2000a), no entanto, o mesmo não se pode dizer sobre o estudo do teor de AAHs em peixes. De facto, a comunidade científica não tem dirigido a mesma atenção para a determinação dos teores e factores que intervêm na formação de AAHs nos diferentes tipos de peixes, sendo que, estes constituem uma das principais fontes proteicas da dieta mediterrânea. Tendo em conta este último aspecto, os peixes escolhidos neste estudo para a determinação das AAHs foram a sardinha e o salmão. São peixes muito apreciados pelos portugueses e, vulgarmente, considerados saudáveis pelo elevado teor em gorduras poliinsaturadas e ómega 3, importantes na prevenção de doenças cardiovasculares. O método de processamento escolhido para efectuar este estudo foi a grelha, recomendado por ser considerado o método culinário mais saudável.

Pretende-se, portanto, com este estudo determinar o teor de AAHs no salmão e sardinha grelhados com vista a aferir se são ou não, realmente, opções saudáveis e se, por outro lado, o tempo de processamento, a

proximidade à fonte de calor e o tipo de fonte de calor podem influenciar, de modo significativo, a formação das AAHs. Além disso, é importante saber se há diferenças qualitativas e quantitativas entre os dois tipos de peixe.

Espera-se que os resultados obtidos contribuam para um melhor conhecimento relativo aos níveis de ingestão das diferentes AAHs, na nossa dieta, e, permitam, sugerir procedimentos que minimizem essa mesma ingestão.

Objectivos

- Determinar o teor de AAHs na sardinha e salmão grelhados.
- Estabelecer diferenças entre os dois peixes, no que respeita ao perfil de AAHs.
- Avaliar a influência do tempo de grelha das sardinhas na formação de AAHs.
- Avaliar a influência do tipo de fonte de calor e da proximidade a esta nos níveis de AAHs formados durante o processamento dos alimentos.
- Comparar a grelha eléctrica com a grelha na brasa, no que respeita aos níveis de AAHs obtidos.
- Estimar os níveis de ingestão destas substâncias numa refeição que inclua sardinha ou salmão grelhado.
- Com base nos resultados obtidos, propor estratégias e técnicas de confecção que minimizem a formação das AAHs em sardinha e salmão grelhados.

I-Parte teórica

1. Valor nutricional dos peixes gordos - sardinha e salmão

Sardinha (*Sardina pilchardus*)

A sardinha é um peixe de água salgada, da família *Cupaidae*, cuja área de distribuição é muito ampla, mas a que se encontra no mercado Português é maioritariamente pescada no oceano Atlântico e no Mediterrâneo. Geralmente, são peixes de pequenas dimensões (10-18 cm de comprimento) que se alimentam de plâncton e formam grandes cardumes.

Apesar da composição apresentada ser relativamente comum no grupo dos peixes gordos, pode variar consoante a espécie em questão e existem mesmo diferenças dentro da mesma espécie. A sardinha é ainda variável consoante a frescura e época do ano da captura. A melhor época de consumo é no Verão, quando apresenta um crescimento e teor de gordura corporal adequado às expectativas do consumidor. Noutras alturas do ano, o teor de gordura é mais baixo e o sabor não é tão apreciado.

A **sardinha grelhada** é uma das formas de consumo de sardinha mais apreciada nos países mediterrânicos, especialmente em Portugal. A grelha é referida como uma das técnicas culinárias mais saudáveis, por diminuir o teor lipídico dos alimentos proteicos, fazendo parte das recomendações dietéticas de restrição calórica e de combate à obesidade.

A Tabela 1 refere-se à composição nutricional da sardinha crua e grelhada, que, como se pode verificar é muito equilibrada. Verifica-se uma diminuição do teor de água após a grelha o que justifica o aumento do teor de macro e micronutrientes. Assim, a sardinha grelhada apresenta 12,3 % de lípidos, principalmente ácidos gordos poliinsaturados e nos quais se incluem os omega 3, sendo por isso classificada de peixe gordo. É um bom fornecedor de proteína (25,0 %) de elevado valor biológico. Além disso, tem quantidades apreciáveis de vitaminas A, niacina, B6 e B12 e diversos minerais, como o cálcio, ferro, fósforo, magnésio e sódio. O seu teor em colesterol é relativamente baixo. Na sardinha grelhada os níveis de lípidos poliinsaturados,

proteínas e vitamina D mantêm-se elevados. No entanto, a percentagem de gordura diminui após a grelha o mesmo acontecendo com a percentagem de água.

Tabela 1. Composição nutricional (por 100g de porção edível) de sardinha crua e grelhada.

Fonte – Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge.

	Sardinha crua	Sardinha grelhada
Energia (kcal)	221	211
Água(g)	63,4	58,8
Proteína (g)	18,4	25,0
Lípidos (g)	16,4	12,3
Saturados (g)	4,7	4,4
Monoinsaturados (g)	4,0	2,0
Polinsaturados (g)	5,6	4,5
Hidratos de carbono (g)	0	0
Colesterol (g)	47	43
Vit. A (µg)	47	50
Niacina (mg)	3,4	5,3
Vit.D (µg)	21	23
Vit.E (mg)	0,66	0,71
Vit. B6 (mg)	0,57	0,61
Vit. B12 (µg)	10	12
Ferro (mg)	1,0	1,1
Fósforo (mg)	314	379
Potássio (mg)	367	419
Sódio (mg)	65	401
Zinco (mg)	1,6	2,0
Magnésio (mg)	31	38

Salmão (*Salmo salar*)

O salmão é um peixe de grandes dimensões da família *Salmonidae*. Peculiar dos mares e rios europeus, é muito procurado pela sua apreciada carne rosada e sabor característico.

O salmão é basicamente um peixe branco. A cor vermelha do salmão é devida a um pigmento chamado astaxantina, produzido através das algas e dos organismos unicelulares, que são ingeridos pelos camarões do mar. O pigmento é armazenado no músculo do camarão ou na casca. Quando os camarões são comidos pelo salmão, estes também acumulam o pigmento nos seus tecidos adiposos. Como a dieta do salmão é muito variada, a sua cor natural toma uma enorme variedade de cores, desde branco ou um cor-de-rosa suave a um vermelho vivo.

O salmão é classificado como um peixe gordo, possuindo um teor elevado de ácidos gordos poliinsaturados. Possui proteínas de elevado valor biológico (que contêm todos os aminoácidos essenciais ao homem e que só podem ser adquiridos através da alimentação). Destaca-se ainda o teor de vitaminas lipossolúveis: A, D, E e K bem como o seu conteúdo em vitaminas B6 e B12. Nos minerais destacam-se o fósforo e magnésio. A sua forma de consumo, mais comum, até porque se julga ser a mais saudável, é grelhado. A Tabela 2 apresenta a composição nutricional do salmão cru e quando cozinhado na grelha.

Tabela 2. Composição nutricional (100g de porção edível) salmão cru e grelhado. Fonte – Instituto Nacional de Saúde Dr Ricardo Jorge

	Salmão cru	Salmão Grelhado
Energia (kcal)	262	308
Água (g)	60,5	49,4
Proteína (g)	16,2	23,8
Lípidos (g)	21,9	23,7
Saturados (g)	4,2	4,5
Monoinsaturado (g)	10,0	8,7
Poliinsaturados (g)	5,1	7,3
Hidratos de carbono (g)	0	0
Vit. A (µg)	33	70
Niacina (mg)	3,6	4,4
Vit. D (µg)	11	9,2
Vit. E (mg)	4,0	4,3
Vit. B6 (mg)	0,45	0,21
Vit. B12 (µg)	1,9	1,2
Ferro (mg)	0,5	0,4
Fósforo (µg)	209	322
Potássio (mg)	301	408
Magnésio (mg)	23	40
Zinco (mg)	0,5	0,9
Sódio (mg)	38	783

1.1.Importância do consumo de peixes gordos- benefícios e riscos

Além de conter proteínas e outros nutrientes como vitamina D e selênio, os peixes gordos contêm um tipo específico de gordura, o ômega-3, que comprovadamente pode reduzir o risco de desenvolver doenças coronárias e diversos outros problemas (Goodnight *et al.*, 1982). Porém, os peixes podem também conter mercúrio e outras substâncias que colocam em risco a saúde e que resultam do aumento da poluição ambiental (dioxinas e PCBs – bifenilos policlorados, por exemplo). Estes factores têm gerado controvérsia quando falamos do consumo de peixe numa dieta saudável. Para sanar estas questões, a Harvard School of Public Health, financiada pelo National Institute of Health dos EUA, desenvolveu um estudo aprofundado sobre o consumo de peixe por adultos e crianças (Mozaffarian e Kim., 2006). Os resultados mostraram que os benefícios de comer uma quantidade modesta de peixe (aproximadamente 340 g) por semana correspondem a uma redução de 36% (95% intervalo de confiança, 20%-50%; $P < .001$) no risco de morte por doenças coronárias. O benefício está directamente relacionado com o consumo de ômega-3, sendo maior para o consumo de peixes gordos como salmão e sardinha.

Combinando resultados de experiências clínicas, estes estudos demonstraram que o consumo de peixe, ou óleo de peixe, reduz também as mortalidades de todas as causas em 17% (95% intervalo de confiança, 0%-32%; $P = .046$).

Este trabalho foi publicado em 18 de Outubro de 2006 no The Journal of the American Medical Association (JAMA) e corresponde ao primeiro estudo detalhado sobre os níveis de ômega-3, mercúrio e outras substâncias nas diversas espécies de peixes e em alimentos como frango, carne de boi, carne de porco e ovos.

Há mais de duas décadas, estudos pioneiros mostraram que os esquimós, que consumiam quantidades elevadas de ômega-3 de peixes do mar, apresentavam taxas muito baixas de morte por doenças coronárias (Dyerberg *et al.*, 1981). Outros estudos mostraram que o ômega-3 dos peixes é capaz de beneficiar o desenvolvimento do cérebro de crianças durante a gestação e infância (Chawford., 1982).

Também foram tidos em consideração dados sobre os efeitos prejudiciais à saúde humana, tendo em conta os produtos químicos encontrados nos peixes (Santos *et al.*, 2002, Bethune *et al.*, 2006). Dados alarmantes de altas concentrações de PBDEs (difenileterpolicromados) em alguns peixes têm levantado discussões a respeito da exposição humana a esses poluentes. Os níveis elevados destes compostos encontrados em salmão (Hites *et al.*, 2004), serviram como um alerta para o consumo de peixes e criou um dilema: de um lado nutricionistas impulsionando o consumo de peixe com altos níveis de ómega-3 e de outro as observações de que cada vez mais poluentes, incluindo os PBDEs, são detectados na gordura desses animais.

Em relação aos principais resultados de Mozaffarian e Kim, 2006, em adultos, foi comprovado que os benefícios do consumo de peixes compensam em muito os seus riscos. Apesar de alguns estudos demonstrarem que os PCBs e as dioxinas são compostos potencialmente cancerígenos, os benefícios do consumo de peixe superam em muito o potencial risco de cancro resultante da ingestão dessas substâncias presentes no peixe. O benefício do consumo de salmão, por exemplo, é 300 vezes superior ao potencial risco de cancro que advem desse mesmo consumo. Além disso, com excepção para os peixes de águas extremamente poluídas, os níveis de PCBs e dioxinas dos peixes são semelhantes aos encontrados para o bife, ovos, frango e manteiga (cerca de 90% destas substâncias provêm de carnes, vegetais e outros produtos de consumo diário).

Além dos PCBs e dioxinas, também o mercúrio é motivo de preocupação, uma vez que, na forma metilada, é extremamente neurotóxico. Para equilibrar os possíveis efeitos adversos do mercúrio, e outras substâncias, com os muitos benefícios do ómega-3, a recomendação pelos responsáveis deste estudo, é que grávidas e crianças comam até duas refeições por semana de peixes como o salmão e o atum, limitando o consumo de grandes predadores como o peixe espada, o tubarão e a cavala, que contêm mercúrio. Esta restrição é apenas para gestantes e crianças pequenas, não para a população em geral. As evidências mostraram que é importante a ingestão de peixes para o desenvolvimento do cérebro do feto, assim a grávida deve apenas evitar os peixes ricos em mercúrio.

Todavia, além das substâncias tóxicas contaminantes dos peixes existem outras substâncias indesejáveis que se podem formar durante o seu processamento: benzo(a)pirenos e AAHs, por exemplo. Estas substâncias, ignoradas no estudo referido anteriormente, são potencialmente cancerígenas e mutagénicas, pelo que, não é possível avaliar o verdadeiro risco/benefício associado ao consumo de peixes sem se considerar a presença destas substâncias e as reais consequências da sua ingestão. De facto, não se pode desprezar o efeito que o processamento culinário pode ter na alteração da composição dos peixes e suas consequências para a saúde.

1.2.Níveis de consumo de peixe em Portugal

Segundo dados de 2003, fornecidos pelo Instituto Nacional de Estatística (INE), os alimentos mais consumidos em Portugal pertencem ao grupo de produtos hortícolas e fruta (226,1 Kg/pessoa/ano). O consumo de lacticínios situou-se à volta dos 126 Kg/pessoa, as gorduras e óleos apresentaram um consumo próximo dos 39 Kg/pessoa e as carnes, pescado e ovos apresentaram um consumo médio de 132 kg/pessoa, durante o ano de 2003. Relativamente a este último grupo, em Portugal, a principal fonte de proteína animal provém do consumo de carne (essencialmente carne de porco e vaca), seguido do consumo de pescado (25,2%) e ovos (6,8%). No que respeita ao consumo de pescado, a maior percentagem recai sobre o peixe fresco, congelado e de conserva, seguido do consumo de moluscos, crustáceos e bacalhau.

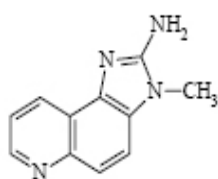
Dados fornecidos pela EAFPA – European Association of Fishing and Auctions – o consumo médio de pescado na Europa situou-se próximo dos 26 Kg/pessoa, durante o ano de 2003, enquanto que, a nível mundial esse valor não ultrapassou os 17 Kg/pessoa. Comparando estes dados com os obtidos para Portugal, em igual período, pode concluir-se que o consumo médio de pescado *per capita* em Portugal (33,5 Kg/pessoa) é muito superior ao da média mundial e europeia. Na esfera mundial os maiores responsáveis pelo consumo de pescado são a China e o Japão. A nível europeu, Portugal, Espanha e Noruega ocupam os lugares cimeiros no consumo *per capita* de pescado (portal da internet FAO - Food and Agriculture Organization of United

Nations). Estes dados revelam, mais uma vez, a importância do consumo de peixe na dieta mediterrânica, com especial relevância em Portugal.

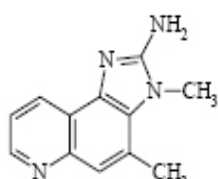
2. Aminas Aromáticas Heterocíclicas (AAHs)

As AAHs são divididas em duas categorias de acordo com os seus precursores e temperatura de formação. As 2-aminoimidazóis ou térmicas são formadas a temperaturas moderadas (acima dos 190°C), provavelmente, como resultado de reacções Maillard. Alguns exemplos incluem IQ, MeIQ, MeIQx, 4,8-DiMeIQx, 7,8-DiMeIQx e PhIP (Figura 1). As 2-aminopiridinas ou pirolíticas são, por sua vez, formadas a elevadas temperaturas (normalmente acima dos 300°C), a partir de proteínas pirolisadas e incluem compostos como Trp-P-1, Trp-P-2, Glu-P-1 e Glu-P-2 (Figura 2). As AAHs podem ainda ser classificadas em dois tipos: as IQ e as não-IQ. O tratamento com 2mM de nitrito não afecta os grupos amino das AAH tipo IQ, no entanto, nas aminas não-IQ esses grupos químicos são convertidos em grupos hidroxilos (Sugimura, 1995). Esta conversão está relacionada com a perda de mutagénese. Em contraste, no tratamento com hipoclorito há perda de mutagénese de ambos os tipos de AAHs.

Quinolinas

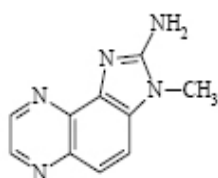


IQ

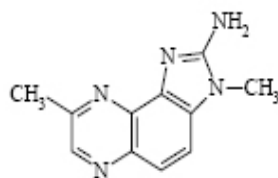


MeIQ

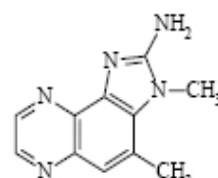
Quinoxalinas



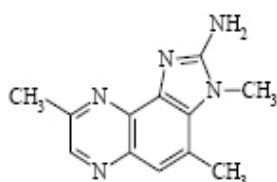
IQx



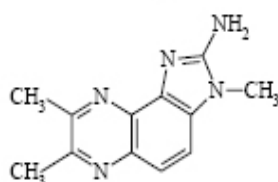
8-MeIQx



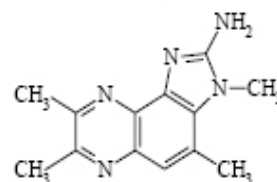
4-MeIQx



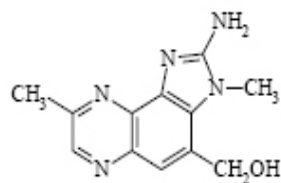
4,8-DiMeIQx



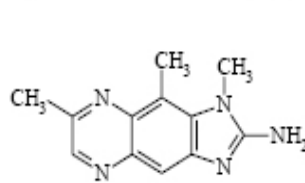
7,8-DiMeIQx



4,7,8-TriMeIQx

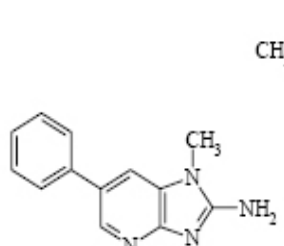


4-CH₂OH-8-MeIQx

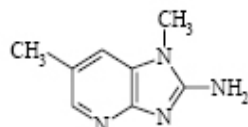


7,9-DiMeIQx

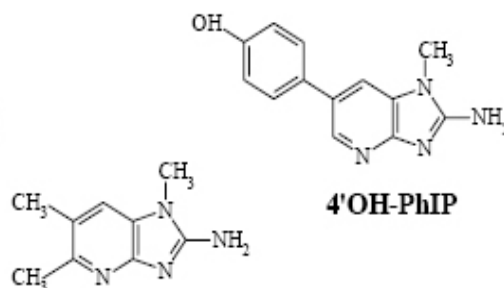
Piridinas



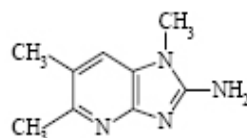
PhIP



1,6-DMIP

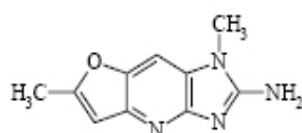


4'-OH-PhIP



1,5,6-TMIP

Fuopiridinas

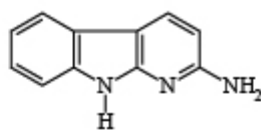


IFP

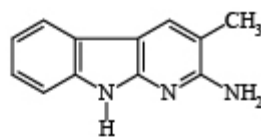
Figura 1. Estrutura química de AAHs térmicas

Piridoindoles

α -carbolinas

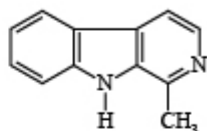


A α C

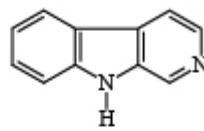


MeA α C

β -carbolinas

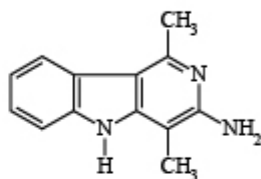


Harman

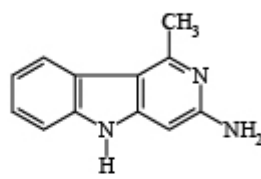


Norharman

γ -carbolinas



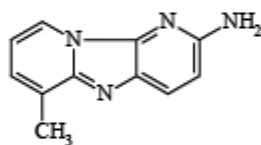
Trp-P-1



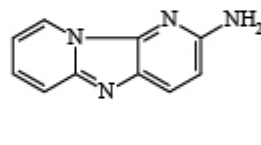
Trp-P-2

Piridoimidazoles

δ -carbolinas

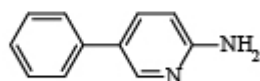


Glu-P-1



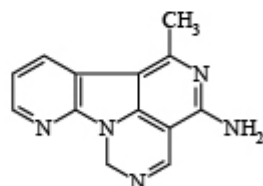
Glu-P-2

Fenilpiridinas



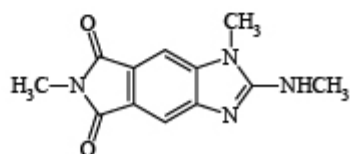
Phe-P-1

Tetraazafluoranteno



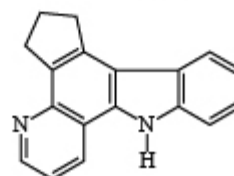
Orn-P-1

Benzimidazol



Cre-P-1

Carbazol



Lys-P-1

Figura 2. Estrutura química de AAHs pirolíticas.

2.1.Nomenclatura

De seguida, está apresentada a nomenclatura e estrutura química de algumas AAHs (Tabela 3)

Tabela 3. Nomenclatura de algumas AAHs.

Imidazo-quinolinas
IQ - 2-Amino-3-methylimidazo [4,5-f]quinoline
MelQ - 2-Amino-3,4-dimethylimidazo [4,5-f]quinoline
Imidazo-quinoxalinas
IQx - 2-Amino-3-methylimidazo [4,5-f]quinoxaline
MelQx - 2-Amino-3,8-dimethylimidazo [4,5-f]quinoxaline
4,8-DiMelQx - 2-Amino-3,4,8-trimethylimidazo [4,5-f]quinoxaline
7,8-DiMelQx - 2-Amino-3,7,8-trimethylimidazo [4,5-f]quinoxaline
TriMelQx - 2-Amino-3,4,7,8-tetramethylimidazo [4,5-f]quinoxaline
Imidazo-piridinas
PhIP - 2-Amino-1-methyl-6-henylimidazo [4,5-b]pyridine
DMIP – 2-amino-1,6-dimethylimidazol[4,5- <i>b</i>]pyridine
IFP – 2-Amino-1,6-dimethylfuro [3,2- <i>e</i>] imidazo [4,5- <i>b</i>] pirydine
Pirido-indóis
α-Carbolinas
MeAαC - 2-Amino-3-methyl-9H-pyrido [2,3- <i>b</i>] indole
AαC - 2-Amino-9H-pyrido [2,3- <i>b</i>] indole
β-Carbolinas
Harman - 1-Methyl-9H-pyrido[2,4- <i>b</i>] indole
Norharman - 9H-pyrido[3,4- <i>b</i>] indole
γ-Carbolinas
Trp-P-1-3 - Amino-1,4-dimethyl- 5H-pyrido [4,3- <i>b</i>] indole
Trp-P-2 - 3-Amino-1-dimethyl- 5H-pyrido [4,3- <i>b</i>] indole
Outras carbonilas
Phe-P-1 – 2-amino-5-fenilpyridine
Lys-P-1 – 3.4-ciclopentenopyridino [3,2- <i>a</i>] carbazole
Orn-P-1 – 4-amino-6-methyl-1 <i>H</i> -2,5,10.10 <i>b</i> -tetraazafluoranteno
Cre-P-1 – 4-amino-1,6-dimethyl-2-methylamino-1 <i>H</i> ,6 <i>H</i> -pirrolo[3,4- <i>f</i>] benzimidazole-5,7-dione
Pirido-imidazóis
Glu-P-1 - 2-Amino-6-methyldipyrido [1,2- <i>a</i> :3',2'- <i>d</i>] imidazole
Glu-P-2 - 2-Amino-dipyrido [1,2- <i>a</i> :3',2'- <i>d</i>] imidazole

2.2. Formação das AAHs

A formação das AAHs térmicas parece dever-se a reacções Maillard que ocorrem entre grupos amina livres dos aminoácidos, péptidos e proteínas e os grupos hidroxil-glucosídicos dos açúcares redutores. Os aldeídos e as cetonas podem reagir de forma semelhante à dos açúcares redutores com os grupos amínicos livres. A formação das AAHs envolve várias reacções intermediárias de alguma complexidade.

Os produtos resultantes das reacções Maillard, como as metil - piridinas e – pirazinas, são os principais precursores das AAHs menos polares. No entanto, os principais precursores das AAHs mais polares são os aldeídos, resultantes de reacções que ocorrem a elevadas temperaturas, e a creatinina (Skog, 1993, Skog *et al.*, 1998).

As AAHs são vulgarmente classificadas em dois subgrupos, de acordo com a estrutura e mecanismo de formação:

a) Aminas térmicas formam-se geralmente a temperaturas à volta dos 200°C e apresentam na sua estrutura um grupo metilaminoimidazólico (Figura 3). Incluem-se neste grupo as quinolinas, as quinoxalinas, as piridinas e as fupiridinas, estas são as que mais frequentemente se encontram nos alimentos proteicos processados, pelo que, são as que mais contribuem para o potencial mutagénico destes alimentos.

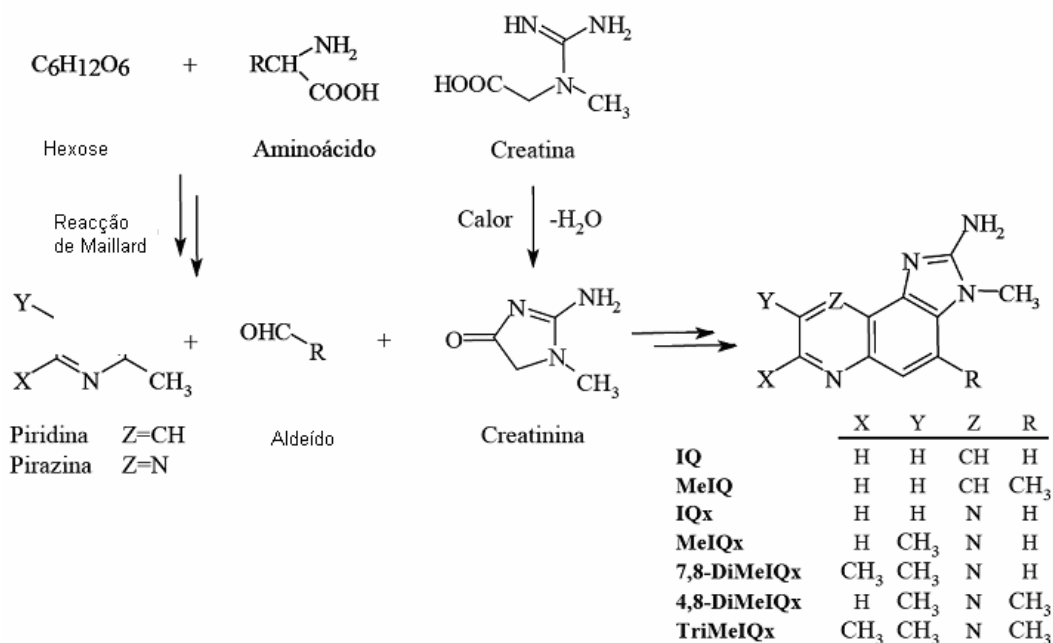


Figura 3. Formação de quinolinas e quinoxalinas a partir de reacções Maillard entre açúcares e aminoácidos seguidas de fusão com creatinina (adaptado de Jägerstad *et al.*, 1991).

Alguns estudos propõem, recorrendo a sistemas modelo, que as quinolinas e quinoxalinas se formam durante o aquecimento de creatina, aminoácidos e açúcares redutores, com ocorrência de reacções Maillard (Jägerstad *et al.*, 1991). Dependendo da identidade do aminoácido, a quinolina ou a quinoxalina obtida é diferente (se o aminoácido presente é a glicina forma-se IQ ou MelQx, se é a alanina, obtem-se o MelQ). A Figura 4 esquematiza a formação das aminas tipo-IQ e tipo IQx.

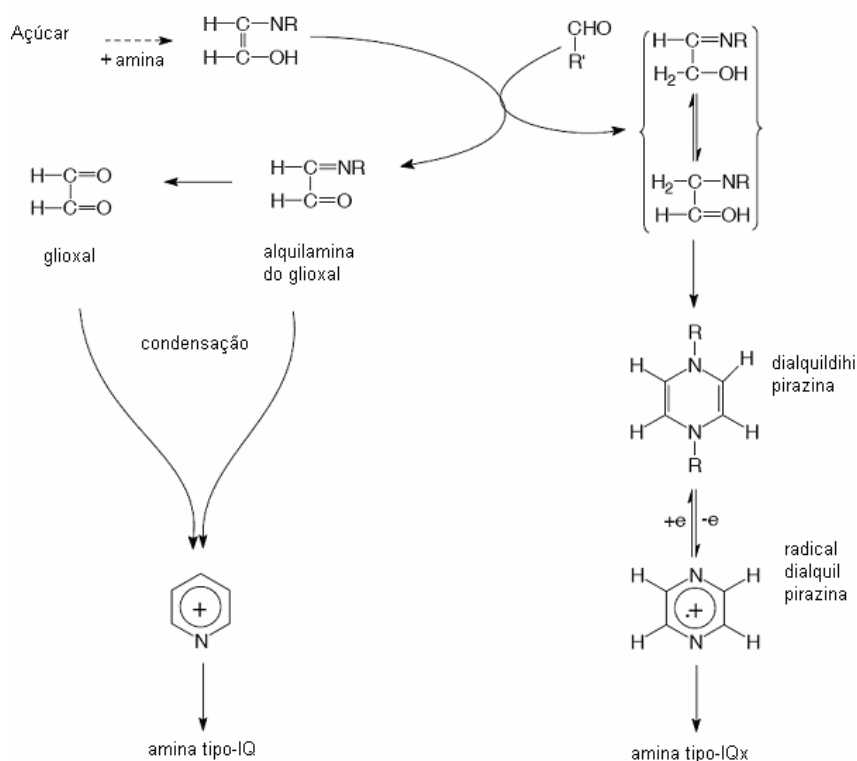


Figura 4. Mecanismo proposto para a formação das aminas tipo-IQ e -IQx (adaptado de Murkovic, 2004).

No que respeita às AAHs térmicas do tipo piridínico, parece que não requerem a presença de piridinas ou pirazinas para a sua formação. Assim sendo, postulou-se que o PhIP se forma por condensação alcoólica de fenilacetaldeído (resultante da degradação térmica da fenilalanina) com creatinina (Figura 5, Zochling e Murkovic, 2002).

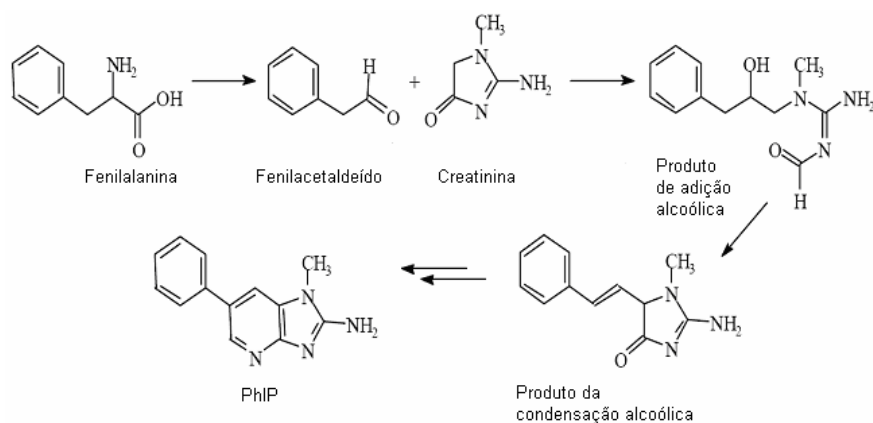


Figura 5. Esquema proposto para a formação de PhIP (adaptado de Zochling e Murkovic, 2002)

b) Aminas pirolíticas – Formam-se geralmente a temperaturas acima dos 300°C por pirólise de aminoácidos e proteínas. Geralmente, estas AAHs têm um grupo amino primário ligado a um anel piridínico, por sua vez, ligado a um anel indol ou imidazol. Neste subgrupo, incluem-se as aminas Harman e Norharman que, apesar de não apresentarem propriedades mutagênicas (não apresentam o grupo amino primário), potenciam a mutagenicidade de outras AAHs. Estes compostos co-mutagênicos podem mesmo formar aductos no DNA na presença de aminas não mutagênicas, como a anilina e a o-toluidina (Barnes e Weisburger, 1983). Estas carbolinas formam-se, muito provavelmente, por pirólise do triptofano (Herraiz, 2000, Figura 6). No entanto, para as restantes aminas pirolíticas o mecanismo de formação não está totalmente esclarecido. Sabe-se apenas que as α e γ -carbolinas se formam por pirólise do triptofano ou de proteínas tanto de origem vegetal como animal. Por sua vez, a Phe-P-1, a Lys-P-1, a Orn-P-1 e a Cre-P-1 formam-se por pirólise da fenilalanina, lisina, ornitina e creatina, respectivamente.

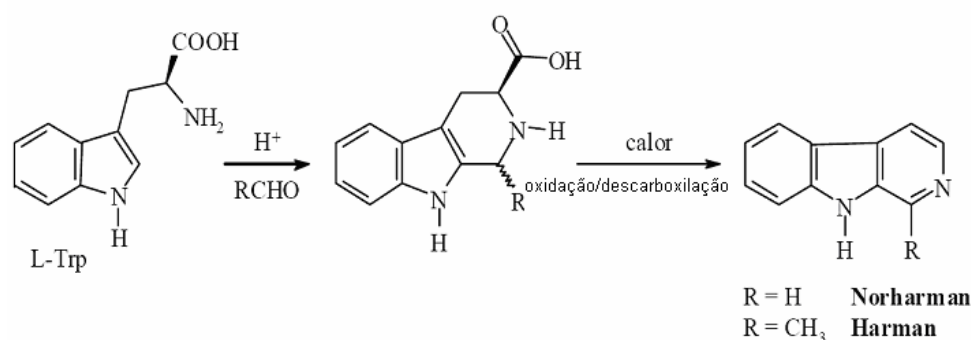


Figura 6. Esquema de formação de aminas Harman e Norharman (adaptado de Herraiz, 2000)

Na Figura 7 está apresentado um possível mecanismo de reacção envolvido na formação das aminas Harman e Norharman (Murkovic *et al*, 2004). De acordo com este mecanismo, o “Tryptophan Amadori Rearrangement Product” (TRPA) sofre hidratação, seguida de β eliminação com formação de um ião oxónio (2). Este pode sofrer uma clivagem C-C e originar um furano-derivado neutro (3) e um ião “imminium” (4). Este último sofre substituição nucleofílica originando uma β carbolina.

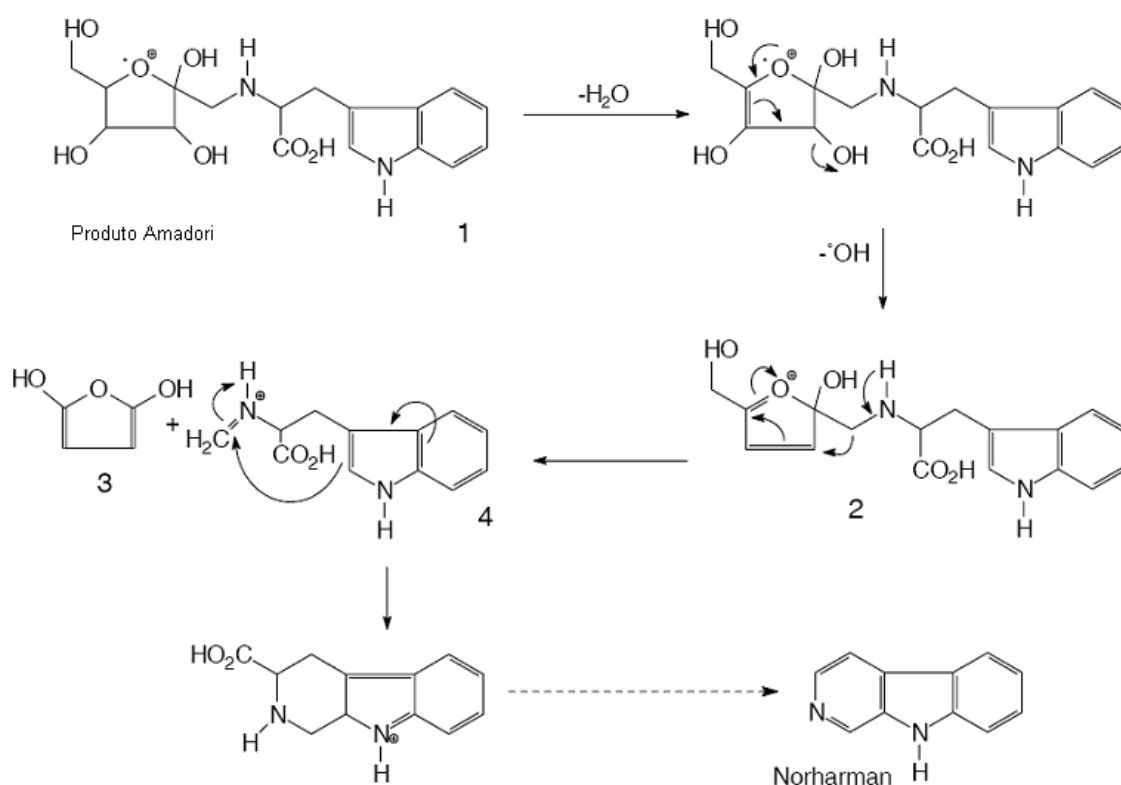


Figura 7. Mecanismo proposto para a formação de Harman e Norharman (adaptado de Murkovic, 2004).

2.3.Sistemas Modelo

A formação de AAHs tem sido extensivamente estudada em sistemas modelo. Inicialmente, o principal objectivo destes estudos focava-se na identificação dos precursores das AAHs presentes nos alimentos proteicos. Mais tarde, estes sistemas modelo passaram a ser utilizados para desenvolver estratégias na redução do teor das AAHs em alimentos e para identificar os complexos mecanismos de reacção envolvidos na sua formação. A grande

vantagem da utilização destes sistemas tem a ver com a redução de reacções paralelas interferentes, uma vez que, apenas os precursores das AAHs estão presentes nos sistemas de reacção.

O trabalho desenvolvido por Pais, *et al.*, 2000, pretendeu identificar os principais precursores da IFP (uma das aminas heterocíclicas encontradas na carne e peixe) e estabelecer os principais factores que afectam a formação das AAHs na carne e peixe. Os sistemas modelos utilizados continham aminoácidos livres, creatinina e glucose nas proporções encontradas no bife e foram submetidos a diferentes temperaturas de processamento, tendo-se verificado um aumento da formação de IFP com o aumento da temperatura até aos 250°C. A partir desta temperatura o teor de IFP diminui, provavelmente, em consequência da sua decomposição. Neste trabalho, verificou-se ainda que a presença de sacarose aumenta em quase 100% o teor de IFP, quando comparada com a glucose. A reacção entre a glucose e a creatinina é suficiente para a formação de IFP, mas a presença de aminoácidos (especialmente glutamato) revelou-se um factor predominante no aumento do seu teor.

Num outro trabalho, realizado em 1999, Pais *et al.*, desenvolveram sistemas modelos na tentativa de simularem diferentes tipos de carne e peixe (Tabela 4). Os resultados obtidos nestes sistemas foram depois comparados com os obtidos para as respectivas carnes e para o peixe. Verificou-se, então, que as aminas identificadas no peixe e nas carnes foram encontradas nos respectivos sistemas modelo. Assim, a MeIQx, a 4,8-DiMeIQx, a PhIP, a DMIP e a IFP foram detectadas em todas as amostras. A IQ e a MeIQ apenas foram detectadas na amostra do peixe e respectivo sistema modelo.

Tabela 4. Concentração de aminoácidos, creatina e glucose (em mg/g de carne). Retirado de Pais *et al.*, 1999.

Aminoácidos	Bife	Peito de frango	Peixe
L-Alanina	0,14	0,34	0,12
L-Arginina	1,07	0,73	0,03
L-Aspartato	0,02	0,10	0,01
L-Glutamato	0,09	0,31	0,02
L-Glicina	0,06	0,21	0,05
L-Histidina	0,14	0,11	0,03
L-Isoleucina	0,05	0,13	0,02
L-Leucina	0,07	0,14	0,02
L-Lisina	0,07	0,25	0,18
L-Metionina	0,06	0,10	0,04
L-Fenilalanina	0,05	0,09	0,04
L-Prolina	0,10	0,56	0,14
L-Serina	0,05	0,14	0,02
L-Treonina	0,28	2,17	0,69
L-Tirosina	0,06	0,09	0,03
L-Valina	0,06	0,13	0,04
L-Creatina	6,33	4,44	7,06
L-Glucose	7,03	0,35	0,21

Estudos realizados em sistemas modelo têm permitido compreender alguns mecanismos de reacção envolvidos na formação das AAHs. Zochling e Murkovic, em 2002, propõem que a formação de PhIP comece apenas com fenilalanina e creatinina, como precursores (Figura 8), ocorrendo a formação de fenilacetaldeído de Strecker. O segundo passo corresponde à condensação do aldeído com creatinina. De seguida, forma-se o anel piridínico de PhIP com intervenção de outra molécula de fenilalanina e de creatinina.

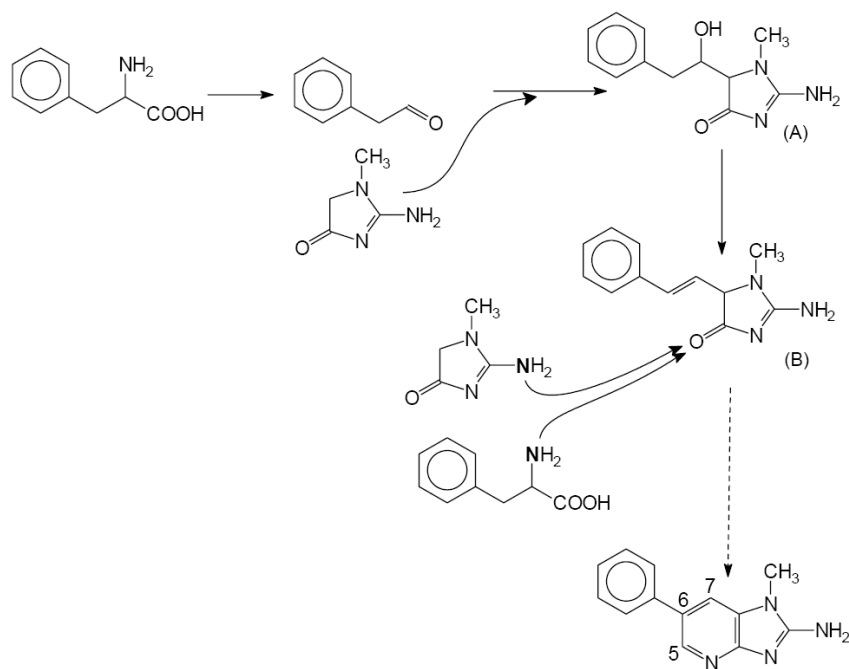


Figura 8. Mecanismo reaccional proposto para a formação de PhIP, retirado de Zochling e Murkovic, 2002.

2.4.Factores que afectam a formação as AAHs

Os factores que favorecem a formação das aminas mutagénicas durante o processamento da carne e peixe têm sido amplamente estudados. Tem-se observado uma marcada influência da **temperatura** sobre a concentração destas substâncias nos alimentos. Assim, a temperaturas inferiores a 160°C, geralmente, não se detecta a presença das AAHs, mas a partir deste valor, o nível de AAHs aumenta com a temperatura (Skog *et al.*, 1995). Outro aspecto importante parece ser o **tempo** de confecção (Figura 9), quanto maior a duração do processamento culinário maior a quantidade de aminas formadas no alimento (Knize *et al.*, 1994).

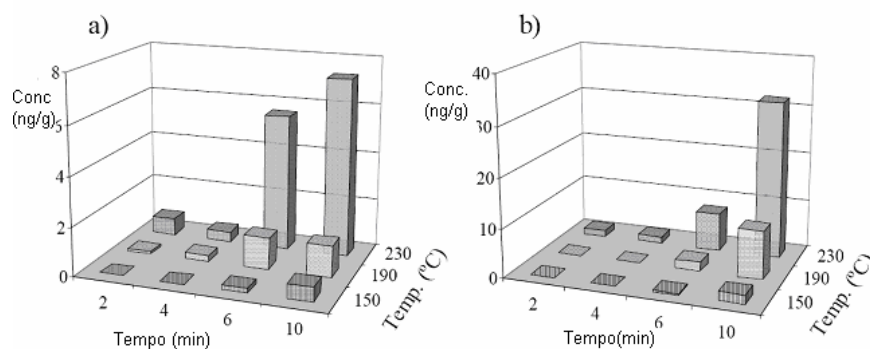


Figura 9. Influência da temperatura e tempo de processamento na formação de MelQx (a) e PhIP (b), retirado de Knize *et al.*, 1994.

O **método de processamento culinário** e a **fonte de calor** utilizada podem, também, influenciar o nível de AAHs no alimento processado. Em geral, os métodos de processamento culinário que implicam temperaturas próximas dos 100°C não geram agentes mutagénicos (ou, pelo menos, não são quantificáveis). Os métodos de confecção que utilizam a convecção indirecta para o aquecimento dos alimentos, como é o caso do forno, produzem níveis baixos de AAHs. O uso prévio do microondas, por seu lado, parece diminuir a formação destas substâncias, no alimento processado, em 90%, durante 2 minutos de exposição. (Felton *et al.*, 1994). No que respeita aos processos culinários que mais contribuem para a formação das aminas, a grelha parece ocupar um lugar primordial, implicando o contacto directo entre o alimento e a fonte de calor.

Sinha *et al.*, 1998, analisaram o teor de AAHs em produtos suínos, cozinhados por diferentes métodos culinários, variando o tempo de processamento para cada um deles. Os resultados variaram não só com o tempo como com o tipo de processamento. Por exemplo, para a PhIP os níveis mais elevados foram os obtidos para o bacon grelhado “muito bem-passado”, enquanto que, para os “cachorro-quentes” não foi detectado qualquer tipo de amina. Na Tabela 5 é possível comparar os teores de PhIP e MelQx (duas das mais abundantes), entre o frango grelhado e o frango frito e entre o peixe grelhado e o peixe cozinhado para “fast food”. Os níveis de PhIP são consideravelmente maiores no peixe e frango grelhados. Estes dados vêm mais uma vez corroborar aquilo que tem sido referido em relação ao efeito da

grelha na formação de substâncias tóxicas. Além da temperatura, a fonte de calor é um aspecto crucial na origem não só das aminas heterocíclicas como de outras substâncias que podem actuar de forma sinérgica. Este último aspecto faz aumentar ainda mais a preocupação relativa à ingestão frequente de alimentos cozinhados desta forma.

Tabela 5. Níveis de PhIP e MeIQx em alguns alimentos sujeitos a grelha e outros processamentos culinários (em ng/g de alimento). Retirado de Knize *et al.*, 1995 e Layton *et al.*, 1995.

Alimento	PhIP	MeIQx
Peito de frango frito	12-70	0
Peito de frango grelhado	27-480	0-9
Peixe grelhado	2-73	0-5
Peixe "fast-food"	0	0
Carne de vaca grelhada	5,7-15	1,1-1,6
Hambúrguer de vaca grelhado	n.d.-16,8	n.d.-4,6

Nota: n.d.-não detectável

Por outro lado, existem formas de evitar ou reduzir a formação das AAHs. As medidas que visam a redução destas substâncias incluem a **utilização de antioxidantes** que evitam a formação de radicais tais como, tocoferóis, ácido ascórbico e fenóis (Figuras 10 e 11), a optimização de utensílios e equipamentos da indústria alimentar, a redução da temperatura de processamento culinário, a selecção de métodos culinários que minimizem a sua formação, entre outras.

Com o intuito de verificar a eficácia dos antioxidantes na prevenção da formação de AAHs, alguns autores (Salmon *et al.*, 1997, Murkovic, 1998) têm recorrido à preparação de marinadas ricas em antioxidantes (sumo de limão e azeite) tendo obtido resultados que demonstram reduções drásticas nos níveis de AAHs, nos alimentos previamente marinados desta forma (Balogh *et al.*, 2000).

Outros compostos antioxidantes têm sido testados na redução da formação de AAHs, tais como o BHT e o BHA. No entanto, os estudos ainda não são conclusivos no que respeita à utilização destes compostos como inibidores da formação de AAHs (Vitaglione e Fogliano, 2004).

Os compostos fitoquímicos têm também merecido atenção pelas suas propriedades antioxidantes e potencialmente inibidoras da formação de AAHs. É o caso das catequinas do chá verde, que parecem intervir nas reacções Maillard, diminuindo o teor de AAHs em sistemas modelo e até em alimentos.

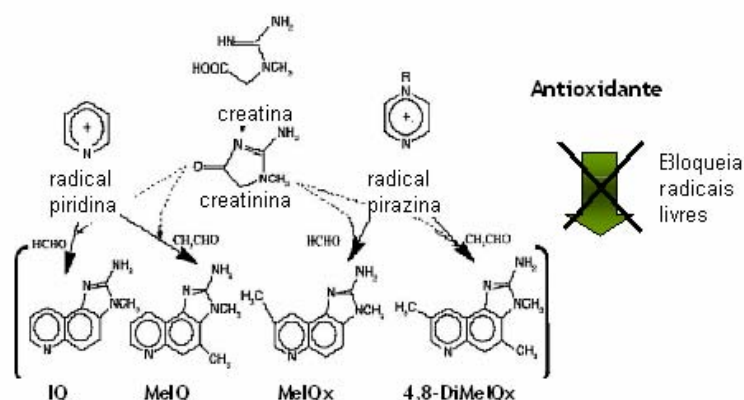


Figura 10. Acção dos antioxidantes na formação de aminas resultantes de reacções Maillard.

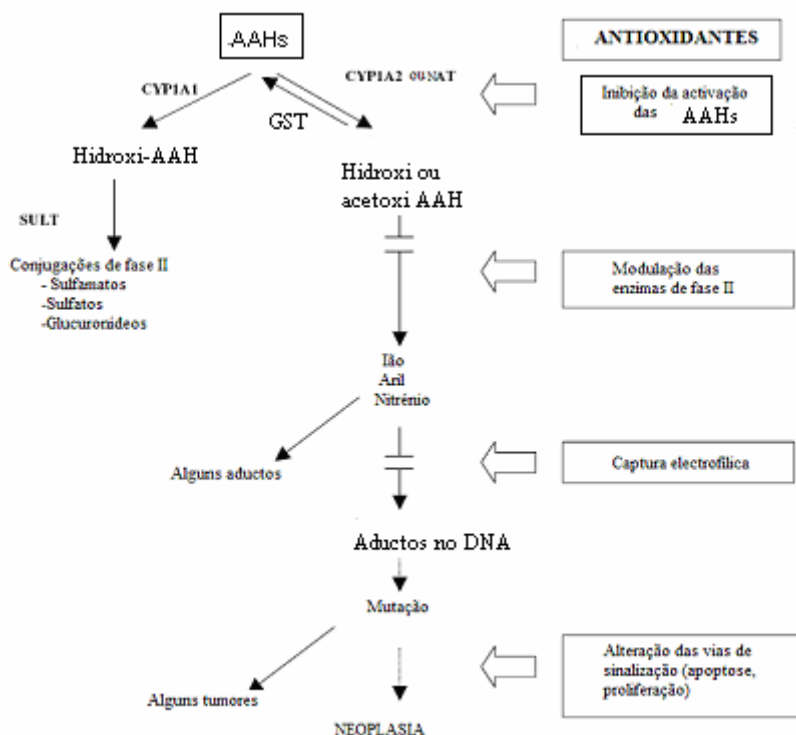


Figura 11. Acção dos antioxidantes na inibição metabólica das AAHs (adaptado de Vitaglione e Fogliano, 2004).

Outro factor que influencia a formação de AAHs diz respeito à **percentagem de gordura** presente no alimento. A gordura permite uma

distribuição de calor mais eficaz com possibilidade de peroxidação lipídica e consequente aumento do potencial mutagénico (Johansson *et al.*, 1995). No entanto, esta é uma questão ainda controversa, uma vez que, alguns estudos atribuem à presença de maiores quantidades de gorduras poliinsaturadas nos peixes, a justificação para que possuam menores teores em AAHs que as carnes (Knize, 1985). Estas gorduras podem estar envolvidas na transformação dos radicais intermediários da formação de AAHs em compostos mais estáveis. Por outro lado, a utilização de azeite reduz a formação de AAHs (Johansson *et al.*, 1995, Monti, 2001), possivelmente, devido à presença de compostos antioxidantes fenólicos, que não só interferem na formação das aminas pirolíticas como também nas etapas iniciais da reacção Maillard.

Finalmente, os próprios alimentos apresentam **diferenças quantitativas e qualitativas**, no que respeita à composição em aminoácidos, creatina e proteínas, que são os principais precursores das AAHs. Assim sendo, alimentos diferentes, submetidos às mesmas condições de processamento, podem apresentar níveis muito diferentes de AAHs. O **teor de água** é outro aspecto a considerar na formação das aminas, pois, a água tem um efeito de diluição dos precursores e, portanto, dificulta as reacções responsáveis pela formação destas aminas. Além disso, a água pode estabelecer ligações com estes precursores, pelo que, se considerarmos que durante o processamento culinário há perda de água, devemos esperar que os métodos culinários que conduzam a maiores perdas de peso sejam os que levem à formação de maiores quantidades de AAHs (Persson *et al.*, 2002). A **adição de NaCl** e de **polissacarídeos**, como forma de evitar a perda de água durante o processamento, tem-se revelado eficaz na diminuição dos teores de AAHs (Schmidt, 1988, Desmond *et al.*, 1998). Além disso, como já referido, uma das formas de reduzir a formação das AAHs será, também, bloquear alguns dos passos reactivos das reacções Maillard. A adição de grandes quantidades de açúcar tem-se revelado eficaz para este efeito, não só em sistemas modelo como em carnes, uma vez que, dificultam a acção da creatinina como precursor das reacções Maillard (Murkovic *et al.*, 1998).

2.5. Níveis de concentração das AAHs nos alimentos

Os primeiros dados quantitativos da presença de AAHs em alimentos foram publicados no princípio da década de 80. Desde então, muitos têm sido os trabalhos realizados no sentido de determinar as concentrações destes mutagénios em alimentos. Dada a grande variabilidade das características do alimento processado e da metodologia analítica utilizada, as concentrações de AAHs descritas na bibliografia abarcam um amplo intervalo de valores.

As AAHs têm sido detectadas na maioria das fontes proteicas quando cozinhadas a determinadas temperaturas. Factores, já referidos no ponto anterior, como o tempo e o método de aquecimento, a temperatura e o método de processamento culinário, podem influenciar de forma significativa a sua formação (Tabela 6, Gross *et al.*, 1993, Keating *et al.*, 1999, Nerurkar *et al.*, 1999). A fritura, por exemplo, origina uma maior quantidade destes compostos na carne do que a cozedura (Gross *et al.*, 1993, Felton *et al.*, 1998). As AAHs são encontradas nos alimentos cozinhados na ordem dos nanogramas. Destas aminas, as mais estudadas são as quinoxalinas, quinolinas e seus derivados. Apesar de existirem essencialmente em carnes e peixes cozinhados, têm sido também detectados em cerveja, vinhos e fumo de cigarro (Manabe *et al.*, 1993).

Tabela 6. Níveis de AAHs em alguns alimentos processados (em ng por grama de alimento). Adaptado de Gross *et al.*, 1993, Gross e Gruter, 1992, Skog *et al.*, 1997, Keaton *et al.*, 1999, Felton *et al.*, 1998, Nerurkar *et al.*, 1999, Busquets *et al.*, 2004, Olsson *et al.*, 2005.

Amostra	Temperatura(°C)	Tempo(min)	AaC	MeAaC	PhIP	MeIQx
Carne de porco						
Frito	160-200	6	-	-	0,05-3,27	0,08-0,86
Carne de vaca						
Crua	-	-	Nd	Nd	Nd	Nd
Cozida	-	-	1,2	-	15,7	2,11
Frita	190	6	3,2	-	23,5	5,1
Frita	190	13	8,9	-	48,5	8,3
Grelhada	210	2*2	0,5	0,4	4,8	2,9
Hambúrguer	200	2*5,6	0,1	0,04	0,6	0,7
Carne de frango						
Cozida	-	-	0,21	nd	2,33	38,1
Frita	-	3	0,1	0,05	11,1	-
Frita	175-200	12	-	-	46,9	Nd
Grelhada	200	2*6,5	0,2	0,02	2,3	0,3
Grelhada	350	-	170	-	21	Nd
Grelhada	-	-	180	15	-	-
Bacalhau						
Assado/forno	275	30	Nd	Nd	3,2	Nd
Panado/frito	175	Nd	Nd	Nd	0,05	Nd
Panado/frito	200	Nd	Nd	Nd	0,4	Nd
Panado/frito	225	Nd	Nd	Nd	2,2	Nd
Cabala						
Frita	180°C	7-19/lado	Nd-3,1	Nd	0,03-12,8	0,01-5,8

Nota: Nd= Não detectável

- = Níveis insignificantes ou níveis desconhecidos

Os níveis de AAHs variam não só com o tempo e temperatura de processamento mas também com o tipo de produto. Os alimentos proteicos cozinhados como a carne, o leite, e ovos são, de facto, os que apresentam níveis mais elevados destes compostos. De todos os factores já mencionados, a temperatura é aquela que mais afecta a produção de AAHs. Assim, fritar e grelhar os alimentos são procedimentos que produzem maiores quantidades destas aminas, pois são realizados a temperaturas elevadas. Verificamos, por exemplo, que, quando a temperatura sobe de 200 para 350°C, há um acréscimo no teor de AaC de 0,2 para 170 ng/g no frango grelhado (Tabela 6).

Por outro lado, a cozedura é um procedimento culinário que se realiza a temperaturas mais baixas, pelo que, as quantidades de AAHs chegam a ser negligenciáveis.

Os alimentos cozinhados por períodos longos (alimentos designados como “bem passados”) apresentam maior produção destas substâncias: a carne de vaca, frita durante 6 minutos, apresenta um teor de AαC de 3,2 ng/g, enquanto que, se a fritura durar 13 minutos, esse valor sobe para 8,9 ng/g (Tabela 6).

No que respeita ao peixe, o teor em AAHs é mais baixo que nas carnes. Apesar da temperatura na superfície do peixe (durante o processamento) ser maior do que na carne, a formação das amins é mais difícil nos peixes. Este aspecto parece ter a ver com vários factores, nomeadamente, maior teor em água e maior capacidade de retenção por parte do tecido muscular dos peixes, elevado teor em poliinsaturados e menor quantidade de precursores relativamente à carne (Salmon *et al.*, 2005). Tal como acontece na carne, quanto maior a temperatura de processamento do peixe maior a quantidade de amins formadas. No caso do bacalhau frito, o nível de PhIP pode subir de 0,05 para 2,2 ng/g, se a temperatura de fritura subir de 150 para 225°C (Tabela 6). No que respeita ao bacalhau assado, os níveis de AAHs são relativamente baixos, tendo-se apenas detectado PhIP. Trata-se de um método de culinária em que o alimento não está em contacto directo com a fonte de calor, pelo que, apesar das temperaturas elevadas, formam-se menores quantidades de AAHs do que durante a fritura.

À semelhança do que acontece no bacalhau, na cabala frita não é detectada a amina AαC, mas é possível encontrar MeIQx, em níveis próximos dos encontrados para a carne de vaca frita durante 6 minutos a 190°C.

2.6. Metabolismo/ Toxicidade das AAHs

Vários estudos indicam que as AAHs são inicialmente metabolizadas pelo CYP1A2 com formação de intermediários N-hidroxilados que podem ser destoxificados por enzimas de fase II tais como UDP- glucuronosiltransferase (UGT) ou activadas por outras enzimas de fase II (acetiltransferase, sulfotransferase). Muitas AAHs têm demonstrado capacidade de formar

aductos de DNA via ataque electrofílico dos iões nitrenio das AAHs sobre o N-2 ou C-8 das bases de guanina (Kim e Guengerich, 2005). A IQ, MeIQ, MeIQx, PhIP, Trp-P-2, Glu-P-1 e MeAxC tem sido descritos como formando aductos na posição C-8 da base guanina do DNA.

Numerosos estudos (Snyderwine *et al.*, 1997) permitiram esclarecer que a activação das AAHs se inicia com a N-hidroxilação do grupo amina ligado ao anel heterocíclico, por parte do CYP1A2 presente no fígado. O metabolito desta reacção pode, então, ser transportado para outro tecido e atingir órgãos, como as mamas e o colón, onde ocorrem reacções de esterificação com grupos sulfato e acetato, daí resultando uma molécula altamente electrolítica. Esta molécula, por seu turno, forma aductos com o DNA que podem ser reparados ou ignorados, sendo que, neste último caso, podem ocorrer erros de replicação celular e, conseqüentemente, mutações. A Figura 12 ilustra o complexo sistema de rotas metabólicas da IQ, incluindo as de activação e destoxificação (Snyderwine *et al.*, 1991). A Figura 13 refere-se às moléculas, resultantes do metabolismo da IQ, envolvidas na formação de aductos de DNA, sugeridos por Sniderwine *et al.*, em 1988.

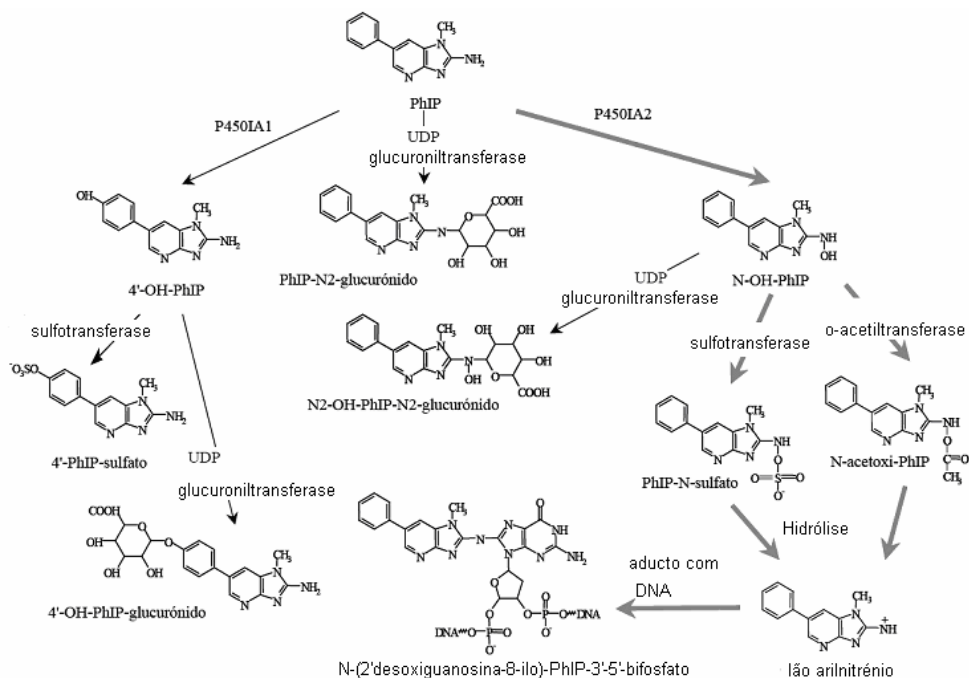


Figura 12. .Metabolismo proposto para a IQ (Adaptado de Snyderwine *et al.*, 1991)

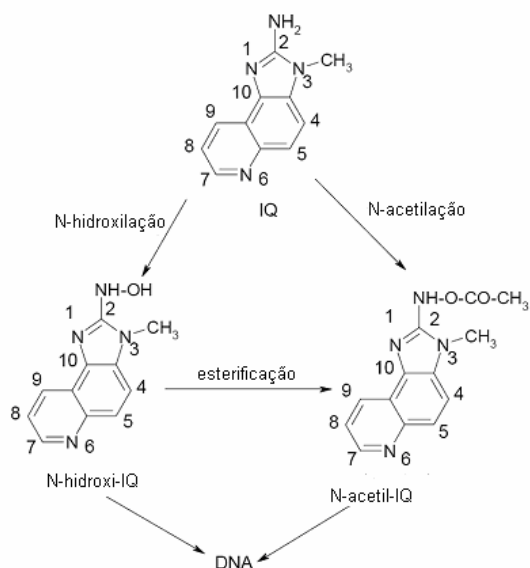


Figura 13. Moléculas resultantes do metabolismo da IQ envolvidas formação de aductos de DNA (adaptado de Snyderwine *et al.*, 1988).

A detecção e avaliação da relação entre a formação de aductos de DNA e o efeito patogénico das AAHs foi, particularmente, facilitada com a aplicação de acelerador MS, que oferece uma enorme sensibilidade na detecção de compostos marcados radioactivamente (Dingley *et al.*, 1999). A espectroscopia UV/VIS, a Ressonância Magnética e a Espectroscopia de Massa são algumas das metodologias analíticas que também permitiram caracterizar as estruturas dos aductos de DNA, resultantes da acção de algumas aminas (Hashimoto *et al.*, 1980).

As diferenças na resposta dos seres humanos à exposição às AAHs dependem de dois factores principais: 1) diferenças no genótipo individual da actividade das enzimas de fase I e II (Bendaly *et al.*, 2007) e 2) modulação pela dieta dos níveis de enzimas pelos indutores ou inibidores encontrados nos alimentos.

2.7. Mutagénese

Os potenciais mutagénicos e carcinogénicos, destas substâncias, têm sido testados em variadíssimos estudos, tendo apresentado resultados de mutagénese positivos em bactérias. O teste de mutagenicidade mais utilizado é o teste de Ames, em que se utilizam espécies auxotróficas em relação à

histidina (Figura 14). Sugimura e Sato, em 1983, utilizando o teste de *Ames*, avaliaram a potência mutagênica das AAHs utilizando um sistema de ativação metabólica, contendo uma fração microsossomal S9 (permite detectar pró-mutagénios) e dois tipos de *Salmonella typhimurium*, um sensível a mutações de eliminação (TA 98) e outro às de substituição (TA 100), tendo demonstrado que as AAHs têm mais resposta no sistema TA98 e que a mutagenecidade específica de algumas é consideravelmente maior que a de alguns agentes mutagénicos/carcinogénicos, como o benzo(a) pireno e a aflatoxina B1 .

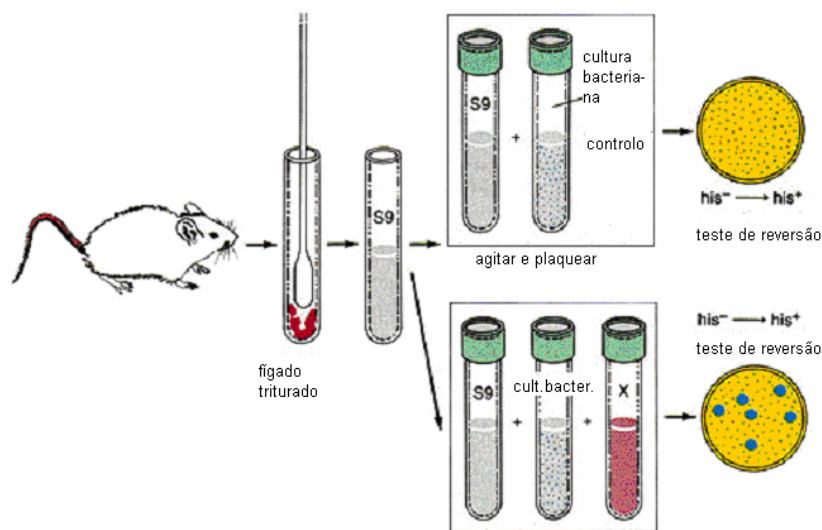


Figura 13. Teste de *Ames* realizado com *Salmonella typhimurium* e sistema de ativação metabólico S9.

As AAHs não são por si só mutagénicas em *Samonella typhimurium*, precisam, para isso, da presença de um sistema metabólico de ativação (Cit.P450). A capacidade mutagénica difere entre as diferentes AAHs, sendo as mais potentes as IQ, MeIQ, MeIQx, DiMeIQx e as menos potentes são PhIP e α -carbolinas (Sugimura e Wakabaiashy, 1990).

O teste de mutagenecidade realizado *in vitro* para as AAHs é, como já se disse, o teste de *Ames* com algumas modificações. Além de estirpes de *Salmonella*, alguns genes (*lacZ*, *lacZa*, *lacZi*) da *Escherichia coli* têm também sido utilizados para analisar a especificidade mutagénica de algumas AAHs (Solomon *et al.*, 1996).

Para além dos testes realizados em procariontes, alguns tipos de células de mamíferos têm vindo a ser utilizadas para testar o potencial

mutagénico das AAHs em eucariontes. Os resultados obtidos nos dois tipos de teste não foram concordantes para algumas AAHs. Assim, por exemplo, a PhIP manifesta baixo potencial mutagénico em bactérias, ao contrário do que acontece nas células eucarióticas (Thompson *et al.*, 1987). Este aspecto poderá estar relacionado, não só com comportamentos genotóxicos diferentes em cada um deste tipo células, como com a eficácia dos sistemas de activação e de reparação.

Alguns genes têm vindo a ser estudados no sentido de verificar as características mutagénicas das AAHs em eucariontes (Wu *et al.*, 1995). Recorrendo a células de ovário de Hamster foi possível verificar que a PhIP e a IQ são responsáveis por transversões de pares de aminos nucleotídicas (GC→TA e AT→TA).

Apesar das AAHs demonstrarem frequentemente potentes efeitos mutagénicos *in vitro*, os resultados dos estudos *in vivo* têm-se revelado menos consistentes, variando com o sexo e tipo de animal escolhido e com o tecido/órgão alvo (Gooderham *et al.*, 2001). Outro factor que pode influenciar os resultados de mutagénese *in vivo*, tem a ver com o tempo de exposição. Apesar de 24h ser tempo suficiente para se formar aductos de DNA, são necessárias algumas semanas para que estabilizem e induzam alterações permanentes na sequência de bases nucleotídicas (Davis *et al.*, 1996). Este aspecto vem enfatizar a importância de diminuir a frequência no consumo de alimentos proteicos “bem passados”, sobretudo, porque o ser humano apresenta sistemas de destoxificação das AAHs até um determinado nível e tempo de exposição.

Em relação à actividade-mutagénica-específica das várias aminos, pode dizer-se que as quinolinas e as quinoxalinas são as mais potentes, enquanto que, a PhIP e as α carbolinas têm menor potencia mutagénica (Sugimura, 1990). No entanto, apesar de apresentar um potencial mutagénico baixo, a PhIP, existe em quantidades dez vezes superiores às das outras AAHs, nos alimentos proteicos. A tabela seguinte apresenta os resultados do teste de Ames para as diferentes aminos. Estes resultados são reveladores dos diferentes potenciais mutagénicos das várias AAHs (Tabela 7), expressos em “revertantes”/ μ g. Os “revertantes” referem-se às bactérias que reverterem de um

estado de dependência à histidina para um estado de autotrofismo em relação à histidina.

Tabela 7. Mutagenicidade, expressa em “revertantes”/μg, das AAHs e de agentes carcinogênicos típicos em *Salmonella Typhimurium* TA98 e TA100. Fonte Sugimura, 1990.

Composto	Revertantes TA98	Revertantes TA100
IQ	433000	7000
MeIQ	661000	30000
IQx	75000	1500
MeIQx	145000	14000
4,8-DiMeIQx	183000	8000
7,8-DiMeIQx	163000	9900
PhIP	1800	120
Trp-P-1	39000	1700
Trp-P-2	104200	1800
Glu-P-1	49000	3200
Glu-P-2	1900	1200
Phe-P-1	41	23
Orn-P-1	56800	-
AαC	300	20
MeAαC	200	120
Aflatoxina B1	6000	28000
AF-2	6500	42000
1-Óxido-4-Nitroquinolona	970	9900
Benzo(a)pireno	320	660
N-Nitrosodietilmina	0,02	0,15
N-Nitrosodimetilmina	0,00	0,23

2.8.Carcinogénese

Quanto à carcinogénese, alguns estudos revelaram um aumento da incidência de tumores em animais submetidos à exposição destes compostos, em relação à população controlo (Adamson *et al.*, 1995). O órgão mais atingido foi o fígado, tanto no rato como no ratinho e no macaco. Contudo, a PhIP induz um aumento da incidência de tumores no intestino e glândula mamária do rato e, no ratinho, afectou as células do sistema imunitário. A IQ, a MeIQx, a Glu-P-1 e a Glu-P-2 também são responsáveis pela indução de tumores intestinais no rato. A acção cancerígena das AAHs deve-se, essencialmente, à formação de aductos no DNA (Sugimura e Wakabayashi, 1998).

Os estudos epidemiológicos são, para já, controversos e exigem estudos mais profundos acerca do potencial carcinogénico e mutagénico em humanos. Snyderwine, 1994 e Layton *et al.*, 1995, revelaram que a presença destas substâncias, na dieta alimentar, pode contribuir para o aumento de

determinados cancros, na população ocidental, em particular a amina PhIP, que parece ser a mais abundante na alimentação.

A carcinogénese das AAHs está bem documentada em vários estudos de longa duração, realizados em tecidos e órgão animais (Sugimura, 2000), facto pelo qual, 9 dessas aminas (MeIQ, MeIQx, PhIP, AαC, Trp-P-1, Trp-P-2, Glu-P-2 e IQ) estão, actualmente, classificadas pela IARC como possivelmente e potencialmente cancerígenas para o Homem (Grupo 2B e 2A, respectivamente). O fígado dos ratos e ratazanas demonstrou ser particularmente susceptível à carcinogénese induzida por estas aminas. Este aspecto pode ser atribuído, em certa medida, ao papel predominante deste órgão na activação e metabolismo das AAHs. Outros órgãos e tecidos também podem ser atingidos, tais como os vasos sanguíneos, glândula mamária, próstata, pulmão, pele, linfa e bexiga.

A susceptibilidade ao efeito destas substâncias parece variar com a espécie, sexo e idade dos animais em estudo, por exemplo, a MeIQx, uma das aminas mais abundantes, causa carcinoma hepatocelular apenas em ratos do sexo masculino, quando expostos a 0,06% w/w desta amina, durante 30 semanas. Por sua vez, a AαC induz tumores de fígado em ratos CDF₁, enquanto em ratazanas F344 não foram detectados quaisquer tumores. A susceptibilidade-dependente-da-idade revelou-se em estudos realizados com PhIP, em que foi detectado cancro da glândula mamária em ratazanas jovens mas não em ratazanas adultas.

Os órgãos alvo de carcinogénese variam também com o tipo de aminas. Assim, no rato a amina IQ tem como órgãos alvo o fígado, o intestino e a pele; a MeIQ, por seu lado, não tem quaisquer efeitos no fígado do rato; a Trp-P-1 e a Trp-P-2 apenas exibem toxicidade no fígado e a MeAαC e AαC atingem além do fígado os vasos sanguíneos (Tabela 8).

Tabela 8.Carcinogénese das AAHs testada em roedores (Sugimura, 2000)

Aminas	Espécies	Concentração(%)	Órgãos alvo
IQ	Rato	0,03	Fígado, intestino, glândula Zymbal, pele
MeIQ	Rato	0,03	Fígado, pulmão,estômago
	Ratinho	0,03	Intestino, pele, glândula Zymbal, pele, cavidade oral, glândula mamária
MeIQx	Rato	0,04	Fígado, glândula Zymbal, pele
	Ratinho	0,06	Fígado,pulmão, sistema hematopoiético
Trp-P-1	Rato	0,015	Fígado
	Ratinho	0,02	Fígado
Trp-P-2	Ratinho	0,02	Fígado
Glu-P-1	Rato	0,05	Fígado, intestino, glândula Zymbal
Glu-P-2	Rato	0,05	Fígado, células sanguíneas
	Ratinho	0,05	Fígado, intestino, glândula Zymbal
A α C	Ratinho	0,05	Fígado, células sanguíneas
MeA α C	Ratinho	0,08	Fígado, células sanguíneas

2.9.Exposição/avaliação dos riscos

Um dos factores chave para o estabelecimento da relação entre a exposição às AAHs e o aparecimento de cancro é o cálculo da sua ingestão diária. Evidentemente, este aspecto depende do método de processamento, dos tipos e quantidades de alimentos consumidos e do tempo de processamento. O estudo destas variáveis permitiu uma estimativa da sua ingestão diária, situando-se entre o intervalo de 0 a 7,1 ng/kg, para cada um destes compostos (Layton *et al.*, 1995, Keating *et al.*,1999). Apesar de serem valores baixos, estas substâncias têm acção sinérgica e por isso torna-se difícil avaliar as reais consequências que advêm do seu consumo.

Os estudos epidemiológicos são ainda muito controversos, tornando necessário um conhecimento mais profundo acerca do potencial carcinogénico e mutagénico destas aminas, em humanos. A dificuldade relacionada com a interpretação dos estudos epidemiológicos conduziu ao desenvolvimento de

biomarcadores de exposição. O nível de exposição às AAHs pode variar consideravelmente de dia para dia, por isso, o biomarcador deve integrar uma exposição ao longo de um determinado período de tempo.

Os biomarcadores estudados podem ser as próprias AAHs e os seus metabolitos excretados na urina. No entanto, ao fim de 12 horas, após a ingestão destas, os metabolitos presentes na urina já não apresentam actividade mutagénica. Este aspecto limita a sua utilização como biomarcador em estudos epidemiológicos. Contudo, uma amostragem significativa pode ser usada para validar o consumo de HAAs (Sinha, 2002).

Como referido anteriormente, as AAHs são rapidamente metabolizadas por processos de destoxificação e bioactivação e depois excretadas. Estudos em humanos, realizados por Reistad *et al.*, (1997), em que analisaram AAHs na urina antes e depois de efectuar hidrólise ácida, verificaram que somente uma pequena fracção dos compostos ingeridos era excretada sem ser metabolizada (DiMeIQx, 1–6%; PhIP, 0.5–2%), a maior parte foi encontrada na urina após hidrólise ácida (DiMeIQx, 13–32%; PhIP, 2–8.5%).

Têm vindo a ser desenvolvidas novas tecnologias para encontrar biomarcadores a longo termo, como sejam a formação de aductos com DNA e a acumulação das AAHs no cabelo humano (Sinha, 2002). Deste modo, outros biomarcadores de exposição incluem a análise de marcadores de aductos de DNA na urina. Alguns estudos indicam que a amina PhIP inicia a interacção com o DNA ao nível do C-8 da desoxiguanosina, assim, o respectivo produto de reparação de DNA - a dG-C8-PhIP – pode ser utilizado como biomarcador da exposição ao PhIP (Fang *et al.*, 2004). A cromatografia de imunoafinidade é útil para a purificação e permite avaliar níveis baixos de exposição. O método mais sensível para a análise de aductos de DNA é usando AAHs com carbono ^{14}C e efectuar a medição dos aductos nas proteínas do soro, é possível detectar aductos de albumina em níveis de 17 fmol PhIP e 11 fmol MeIQx g^{-1} de proteína. O PhIP acumula-se no cabelo e por isso pode ser usado como biomarcador (Reistad *et al.*, 1999).

Diferentes estudos de consumo de HAAs realizados nos Estados Unidos da América, indicam que uma estimativa para o consumo de HAAs, num adulto, varia entre 6,3 ng/kg e 20,1 ng/kg por dia, enquanto a estimativa

para a população Europeia varia entre 2,3 ng/Kg e 6,6 ng/Kg por dia. Estas estimativas podem reflectir diferenças culturais nas preferências alimentares e no modo de preparação dos alimentos, evidenciado por um menor consumo de AAHs na população Europeia (Keating e Bogen, 2004).

Porém, o nível de exposição às AAHs não é o único factor que importa avaliar para estimar o risco associado ao seu consumo. Existe uma predisposição genética que influencia o efeito das AAHs no organismo. Em virtude de necessitarem de uma biotransformação enzimática, para exibirem mutagenicidade, os polimorfismos enzimáticos são responsáveis por diferentes susceptibilidades à exposição de agentes cancerígenos. Assim sendo, enquanto alguns grupos populacionais originam compostos potencialmente tóxicos, durante a metabolização, outros, pelo contrário, transformam-nos em compostos inofensivos ao organismo. Este aspecto tem suscitado o interesse pela identificação e caracterização dos genes envolvidos no metabolismo das AAHs (Robert -Thomson *et al.*, 1999, Gooderham *et al.*, 2001).

Cientistas americanos estimaram em 1 por cada 10.000 americanos a possibilidade de padecerem de cancro resultante da exposição às AAHs (National Cancer Institute). Apesar de ser uma probabilidade remota, do ponto de vista da saúde pública, não pode ser negligenciável. Esta estimativa foi conseguida graças ao cruzamento de vários dados: composição dos principais alimentos consumidos na dieta americana; teores das diferentes AAHs presentes em cada um desses alimentos; níveis de ingestão diária desses produtos; potencial cancerígeno (em ratos) para cada uma das aminas.

Este tipo de estimativas apresenta, no entanto, uma série de limitações:

- negligencia a acção protectora/sinérgica resultante do consumo de outros alimentos
- os estudos realizados para a determinação dos níveis de AAHs, nos alimentos, nem sempre, conseguem simular as condições de culinária domésticas
- os dados relativos aos teores de AAHs nos alimentos são ainda insuficientes

- a extrapolação para os humanos dos resultados obtidos em ratos, nos testes de carcinogénese, nem sempre, é apropriada.

2.10. Metodologias analíticas para identificação e quantificação de AAHs em alimentos

A descoberta das AAHs em alimentos e os indícios da sua estreita relação com alguns tipos de cancro revelaram a necessidade de quantificar esta família de compostos.

Alguns métodos de análise têm sido desenvolvidos no sentido de fazer a quantificação destes compostos, em alimentos proteicos processados termicamente. No entanto, devido, por um lado, ao baixo nível de concentração a que se encontram estas espécies e, por outro, à elevada complexidade da matriz em que se encontram, não é fácil dispor de métodos adequados à sua determinação. Este aspecto torna importante, não só o desenvolvimento de métodos analíticos de quantificação eficazes, como também métodos extractivos e de separação das espécies a analisar.

A **Extracção Líquido-Líquido (LLE)** é o método preferido, pela maioria dos autores, como primeiro passo de separação da espécie a analisar da matriz. A LLE pode ser conseguida com um solvente orgânico (diclorometano, etilacetato, ou dietileter), de forma a retirar interferências de carácter ácido ou neutro Toribio *et al.*, 2000a).

A estrutura das AAHs consta de vários anéis aromáticos conjugados, alguns dos quais têm um ou mais nitrogénios, sendo possível a **Cromatografia Líquida (LC)** como técnica de separação (Toribio *et al.*, 2000a). A LC é baseada na separação física que envolve uma fase estacionária e uma solução líquida que contém a espécie de interesse (fase líquida). Em geral, a fase estacionária interage com a espécie de interesse permitindo uma separação selectiva. Dependendo das condições de eluição, esta técnica pode ser utilizada como técnica semi-preparativa na recolha fraccionada de diferentes compostos. Quando o objectivo não é a separação, mas a purificação, a LC é utilizada como um passo de clarificação da amostra. Neste caso, os compostos de interesse são retidos e os interferentes são eliminados em resultado da lavagem do adsorvente. A espécie é, de seguida, eluída com solvente apropriado (por exemplo acetona). A adsorção em resinas foi o primeiro

método utilizado na purificação das HAAs, como por exemplo a Ambelite XAD-2, mas, actualmente, Sephasor HP e a sílica gel também podem ser utilizados na LC como fase sólida.

O método de extracção desenvolvido, em 1990, por Gross, baseado no acoplamento da **Extracção Líquido-Líquido (LLE) com a Extracção em Fase Sólida (SPE)**, revelou-se um êxito, pelo que, embora com algumas modificações, continua a servir de base a muitos procedimentos utilizados actualmente, nomeadamente, o utilizado neste trabalho. O tratamento começa com a dispersão da amostra em meio alcalino e posterior mistura com terra de diatomácias, que funciona como suporte sólido para a LLE. As HAAs são eluídas com diclorometano num cartucho SPE e, por último, eluídos num cartucho C18. Este método é recomendado para preparação de amostras aquosas podendo ser realizado num largo intervalo de pH (entre 1 e 13). Em relação à LLE clássica, as vantagens são: minimizar a formação de emulsões, permitir uma separação mais rápida e diminuir a quantidade de solvente. Mas, no entanto, apresenta limitações quando realizada em amostras de matriz complexas, exigindo passos de purificação mais eficientes (por exemplo, usando uma coluna Blue Cotton, Toribio *et al.*, 2000b).

Em resposta a algumas desvantagens das técnicas de extracção tradicionais, tais como a utilização de solventes tóxicos e o entupimento dos cartuchos, alguns autores introduziram uma técnica de extracção bastante eficaz – a Microextracção em Fase Sólida (SPME). A Microextracção em Fase-Sólida desenvolvida por Arthur e Pawliszyn, em 1990, é uma técnica relativamente nova de preparação de amostras, na qual se utiliza uma fibra de sílica fundida revestida por um filme fino de um polímero ou de um adsorvente sólido. A espécie presente na amostra é directamente extraída e concentrada na fibra (Pawliszyn, 1997). Esta técnica envolve dois processos: adsorção ou partição das espécies entre o revestimento e a amostra e a desadsorção térmica das espécies no injector do cromatógrafo a gás (Quach *et al.*, 1999).

A literatura apresenta uma lista de fibras comercialmente disponíveis e relaciona estas com o tipo de composto em que pode ser utilizada (Kataoka *et al.*, 2000), porém, estas devem ser conferidas experimentalmente. Assim, vários tipos de revestimento de fibras são encontrados para extracção de diferentes compostos. A afinidade da fibra pelo composto depende do princípio

“semelhante dissolve semelhante”. Cárdenes *et al.*, 2004, testaram a eficácia de diferentes fibras, disponíveis no mercado, para a extracção das AAHs e concluíram que o SPME acoplado a HPLC-DAD permite simplificar os passos de purificação e evitar a utilização de solventes orgânicos.

Actualmente, a determinação das HAAs são realizadas por métodos cromatográficos e electroforéticos. A **Cromatografia Gasosa** é usada pela simplicidade, elevado poder de resolução, baixo custo e, quando acoplada a MS, confere grande sensibilidade. Algumas HAAs (Trp-P-1, Trp-P-2, AαC, etc.), devida à sua baixa polaridade, podem ser analisadas sem prévia derivatização. No entanto, a maioria são polares e não voláteis exigindo procedimentos de derivatização para determinação de concentrações mais baixas. Também é possível o uso da Cromatografia Gasosa (Kataoka e Kijima, 1997) com detecção de captura de electrões.

No entanto, o método de análise por **HPLC (Cromatografia Líquida de alta eficiência)** de fase reversa é o mais utilizado (Takahashi *et al.*, 1985). O HPLC é utilizado porque evita reacções de derivatização e permite o acoplamento a vários sistemas de detecção, tendo sido o escolhido na realização deste trabalho.

Todas as AAHs têm um espectro característico no UV com elevado coeficiente de extinção molar e podem ser oxidadas electroquimicamente (algumas são mesmo fluorescentes), o que torna possível a **detecção por UV**. No entanto o método mais utilizado é o **Detector de díodos (DAD)**, que permite a identificação “*on-line*” (com acesso a uma biblioteca de dados) apresentando custos baixos (Sinha *et al.*, 1998). A **Fluorescência** pode ser acoplada ao DAD possibilitando menos interferências que a detecção por U.V.. No entanto, e apesar de ser mais sensível que a detecção por díodos, a detecção por fluorescência apenas permite detectar as AAHs menos polares.

Outra alternativa é **Espectroscopia de Massa (MS) com ionização à pressão atmosférica**, pois as AAHs sofrem protonação com facilidade, proporcionando picos intensos, adequados à sua quantificação. A MS apresenta várias vantagens, nomeadamente, a elevada sensibilidade e selectividade, permite a redução de interferências comparativamente com o UV. e os passos para isolamento das espécies são reduzidos. A detecção por MS pode ser acoplada à LC, recorrendo a fontes de ionização por **ESI**

(Electrospray Ionisation), à Ionização Química a Pressão Atmosférica (**APCI**) ou à Ionização a Pressão Atmosférica (**API**). No entanto, este último mecanismo de ionização (API) origina espectros com poucos fragmentos, como foi demonstrado por Galceran *et al.*, 1996.

Estes mesmos sistemas de detecção podem ser utilizados em **Electroforese Capilar (CE)**, uma técnica de elevada eficácia (Puignou *et al.*, 1997) e que permite o uso de pequenos volumes de solventes e de amostra, comparativamente com o HPLC. A CE pode ser acoplada ao UV, DAD; **ED (Electrochemical Detection)** e MS (Puignou *et al.*, 1997, Mendonsa e Hurtubise, 1999, Olsson *et al.*, 1997, Zhao *et al.*, 1998) com bastante sucesso.

O método imunoenzimático de **ELISA** tem sido realizado com sucesso devido à sua elevada sensibilidade e selectividade e, ainda, por tornar possível a utilização de um pequeno volume de amostra. Nesse sentido, foram desenvolvidos alguns Anticorpos Monoclonais (MAbs) na determinação das aminas IQ, MeIQ, MeIQX, 4,8-DiMeIQx e PhIP. (Vanderlaan *et al.*, 1988, 1989).

A Tabela 9 apresenta um quadro resumo de alguns dos métodos de análise mais utilizados para a análise de AAHs em diferentes matrizes.

Tabela 9. Exemplos de alguns métodos de análise de HAAs em amostras.

Amostra	Método	Autores
Extracto de carne liofilizada	LC-MS	Toribio <i>et al.</i> , 2000a)
Extracto de vitela	LC-MS	Galceran <i>et al.</i> , 1996
Padrões dissolvidos	GC-MS	Kataoka e Kijima, 1997
Extracto de bife	HPLC-DAD	Takahashi <i>et al.</i> , 1985
Extracto de vitela	CE-UV	Puignou <i>et al.</i> , 1997
Padrões dissolvidos	CE-MS	Zhao <i>et al.</i> , 1998
Extracto de porco	CE-ED	Olsson <i>et al.</i> , 1997
Extracto de bife	ELISA	Vanderlaan <i>et al.</i> , 1988, 1989
Extracto de galinha	HPLC-DAD/fluorescência	Sinha <i>et al.</i> , 1995

II-Parte experimental

1. Materiais e Métodos

1.1.Reagentes

Os compostos estudados - 2-amino-3-metilimidazo[4,5-f]quinolina (IQ); 2-amino-3,4-dimetilimidazo[4,5-f]quinolina (MeIQ); 2-amino-3,8-dimetilimidazo[4,5-f]quinoxalina (MeIQx); 2-amino-3,4,8-trimetilimidazo[4,5-f]quinoxalina (IQx); 2-Amino-3-methylimidazo [4,5-f]quinoxaline (4,8-DiMeIQx); 2-amino-3,7,8-trimetilimidazo[4,5-f]quinoxalina (7,8-DiMeIQx); 2-amino-3,4,7,8-tetrametilimidazo[4,5-f]quinoxalina (TriMeIQx); 2,2-amino-1-metil-6-fenilimidazo[4,5-b]piridina (PhIP); 3-amino-1,4-dimetil-5H-pirido[4,3-b]indole (Trp-P-1); 3-amino-1-metil-5-pirido[4,3-b]indole (Trp-P-2); 2-amino-3-metil-9H[2,3-b]indole (MeAxC); 2-amino-6-metildipirido[1,2-a:3',2'-d]imidazole (Glu-P-1) e 2-amino-dipirido[1,2-a:3',2'-d]imidazole (Glu-P-2)- foram comprados à Toronto Research Chemicals (North York Ontário, Canada). As soluções padrão de 100 µg/mL foram preparadas com metanol sendo utilizadas para posteriores diluições.

O metanol, o acetonitrilo e o diclorometano (DCM) utilizados para HPLC foram fornecidos pela Merck (Darmstadt, Germany). Os compostos químicos usados para o tratamento da amostra por SPE (hidróxido de sódio, ácido clorídrico, acetato de amónio) e para a fase móvel (trietilamina) eram de grau analítico e foram também adquiridos pela Merck.

Os reservatórios de Extrelut e o material de enchimento Extrelut HM-N Terra de Diatomácia foram obtidos a partir da Merck (Darmstadt, Germany). As colunas de extracção em fase sólida PRS 500 miligramas, C₁₈ 100 e 500 miligramas foram obtidas da Varian (Harbor City, USA).

1.2.Equipamento

O método utilizado para a preparação da amostra foi baseado no método de Galceran *et al*, 1996, com algumas modificações.

Na homogeneização das amostras foram utilizados os aparelhos vortex da marca Vortex Mixers vv3 (VWR) e ultrassons da marca ultrasonic cleaner economic series (FungiLab SA).

O pH de todas as soluções foi corrigido usando um eléctrodo de vidro associado a um medidor de pH (MicroPH 2001, Crison, Barcelona, Spain). As soluções foram filtradas por uma membrana de nylon – 0,2 µm (Teknokrom) antes de serem injectadas no sistema de HPLC.

O equipamento da Supelco Visipred (Supelco, Gland, Switzerland) foi utilizado para manipular as colunas de extracção em fase sólida.

As amostras foram evaporadas com a unidade evaporativa Reactive-VapTM (Pierce) com aquecimento Reacti-Therme (Pierce).

A análise cromatográfica foi efectuada numa unidade analítica de HPLC (Jasco) equipada com uma bomba Jasco PU – 1580, com um detector de comprimento de onda múltiplo MD 910 e outro de fluorescência FP-920 e um injector automático Jasco AS-950. A coluna utilizada foi uma TSK gel ODS80 (Toyo Soda) (5 micrometros, 250 nm de comprimento, 4,6 mm de diâmetro interno). Foi utilizado o software The Borwin PDA Controller Software (JMBS Developments, Le Fontanil, France).

1.3.Amostras

As amostras de sardinhas (15), com cerca de 18 cm de comprimento e peso médio de 80 g, foram adquiridas no litoral de Portugal, na zona de Ovar, na estação do Verão, em estado considerado fresco. As amostras de salmão do Atlântico, fresco partido em postas, com cerca de 3 cm de altura e 12 de largura e 18 cm de comprimento (num total de 6, com um peso médio de 80g), foram adquiridas numa peixaria do distrito do Porto.

1.4. Condições de grelha

Na grelha do peixe em carvão prepararam-se brasas num grelhador apropriado com 15 cm de altura, 35 cm de largura e 52 cm de comprimento. O peixe foi virado uma única vez durante a grelha no meio do tempo total de cocção. Não se adicionou sal, nem óleo na superfície do peixe antes ou após a grelha. A temperatura foi medida com um termómetro digital (part no. 0560 9260, Testo 926, Lenzkirch, Germany) contendo uma sonda (0603 1992, Testo 926, Lenzkirch, Germany).

As sardinhas foram submetidas a diferentes condições de processamento em condições controladas, conforme se descreve a seguir:

- sardinhas grelhadas durante 5 minutos, de cada lado, colocadas a 15 cm do carvão e a uma temperatura de 280 °C, classificadas, pelo seu aspecto como “mal passadas”, mas apropriadas para consumo. Estas amostras foram designadas por Sardinhas A.

- sardinhas grelhadas durante 7 minutos, de cada lado, colocadas a 15 cm do carvão e a uma temperatura de 280 °C, classificadas como “bem passadas”. Estas amostras foram designadas por Sardinhas B.

- sardinhas grelhadas até um grau de cocção médio, colocadas a diferente distância do carvão e durante um período de tempo variável. Estas amostras foram designadas por C e D. As Sardinhas C foram grelhadas lentamente e afastadas da fonte de calor (25 cm) enquanto as Sardinhas D foram grelhadas rapidamente e próximo da fonte de calor (12 cm).

- sardinhas usadas nos ensaios de recuperação e na avaliação do limite de detecção do método, grelhadas durante um período de tempo muito curto (3 minutos) a uma temperatura de 280°C e colocadas a 15 cm do carvão, com o objectivo de serem amostras brancas (sem AAHs).

As sardinhas assim cozinhadas foram pesadas, após o que lhes foram retiradas as, respectivas, espinhas e cabeças, para posterior pesagem e obtenção do peso da porção edível.

No que respeita às postas de salmão, estas foram submetidas a 3 tipos de condições de grelha, em duplicado:

- postas grelhadas no carvão, próximas da fonte de calor (10 cm). A temperatura ambiente próxima do carvão rondava os 300°C. O tempo de

grelha, para ficarem com a superfície tostada e “bem passado” no interior, foi de 6 minutos de cada lado, estas amostras foram designadas Postas A;

- postas grelhadas no carvão a uma distância de 25 cm. A temperatura ambiente junto à grelha rondava os 200°C. O tempo de grelha, para ficarem com aspecto semelhante às postas grelhadas junto ao carvão, foi de 20 minutos de cada lado, amostras designadas por Postas B;

- postas grelhadas em grelha eléctrica. A temperatura ambiente, junto da grelha, que estava colocada imediatamente acima da fonte de calor, situava-se à volta dos 200°C. O tempo de grelha para ficarem com aspecto semelhante às amostras anteriores, foi de 11 minutos de cada lado, estas amostras foram designadas Postas C.

Após a grelha as amostras foram arrefecidas à temperatura ambiente. Cada uma das postas de salmão foi pesada antes e depois do processamento culinário. De seguida, procedeu-se à recolha das superfícies externas de cada posta de salmão (crosta com cerca de 5 mm), para posterior pesagem e análise das AAHs. As espinhas, pele e o interior das postas de peixe foram também pesados e, de seguida, rejeitados. Para aumentar a sensibilidade do método e deste modo conseguir quantificar teores mais baixos de AAHs no salmão, efectuou-se a análise das aminas na crosta exterior, atendendo a que no interior não se atingem temperaturas elevadas e por isso não formam AAHs em quantidades detectáveis, no entanto, para o cálculo final do teor de AAHs no salmão grelhado o peso total da posta foi tido em conta.

As camadas externas de cada posta de salmão, foram separadamente trituradas numa Moulinette Picadora (Moulinex) e, de seguida, acondicionadas em frascos devidamente identificados e armazenados a -20 °C até à análise das AAHs.

1.5.Extracção e purificação

O procedimento de extracção e purificação das AAHs em extractos de peixe está esquematizado na Figura 14. Os passos extractivos foram os mesmos para cada uma das amostras, independentemente de se tratar de sardinhas ou de salmão.

Para a preparação da amostra procedeu-se à pesagem de 5 gramas de amostra em frascos adicionando-se, de seguida, 20 mL de hidróxido de sódio (NaOH) 1 M. A amostra foi colocada no ultrassons durante 10 minutos à temperatura ambiente e depois agitada durante 1 hora no agitador ultra Turray. Esta suspensão alcalina foi depois misturada num almofariz de vidro com o material de enchimento Extrelut (16 g) e transferida para a coluna de Extrelut. Para activar as colunas de extracção em fase sólida PRS 500 mg procedeu-se à adição de 7 mL de diclorometano (DCM) e acoplou-se à coluna de Extrelut. Passaram-se, de seguida, 75 mL de DCM através das colunas de SPE para extrair da terra de diatomáceas as espécies a analisar.

Para obter a fracção de AAHs menos polares (Trp-P-1, Trp-P-2, PhIP, AαC e MeAαC) adicionaram-se 6 mL de ácido clorídrico a 0,01 M, 15 mL de metanol: ácido clorídrico (60:40) a 0,1 M e 2 mL de água na coluna de SPE PRS 500 mg, neutralizando-se, de seguida, a solução obtida com 0,5 mL de amoníaco e diluindo-se os solventes orgânicos com 25 mL de água. Esta solução foi passada por uma coluna de SPE C18, 500 mg, previamente activada com 5 mL de metanol e outros 5 mL de água. Posteriormente, lavou-se a coluna de SPE com 5 mL de água. As AAHs presentes na coluna de SPE foram eluídas com 1,4 mL de metanol: amónia (9:1) para um microtubo de centrifuga de 2 mL.

Para obter a segunda fracção de AAHs (Glu-P-1; Glu-P-2; IQ; MeIQx; 4,8-DiMeIQx; 7,8-DiMeIQx) utilizou-se uma coluna de SPE C18 100 mg, previamente activada (como a coluna C18, 500 miligramas), e acoplou-se à coluna de SPE PRS 500 mg. Passaram-se 20 mL de acetato de amónio 0,5 M com pH 8,5 e, de seguida, lavou-se a coluna com 5 mL de água. As AAHs adsorvidas foram eluídas com metanol: amónia (9:1) para um microtubo de centrifuga de 2 mL.

Ambas as fracções foram evaporadas em corrente de azoto e as espécies a analisar ressuspendidas em 80 µL de metanol: fase móvel (1:1).

Os extractos finais foram analisados utilizando um método de HPLC-DAD / fluorescência descrito na próxima secção.

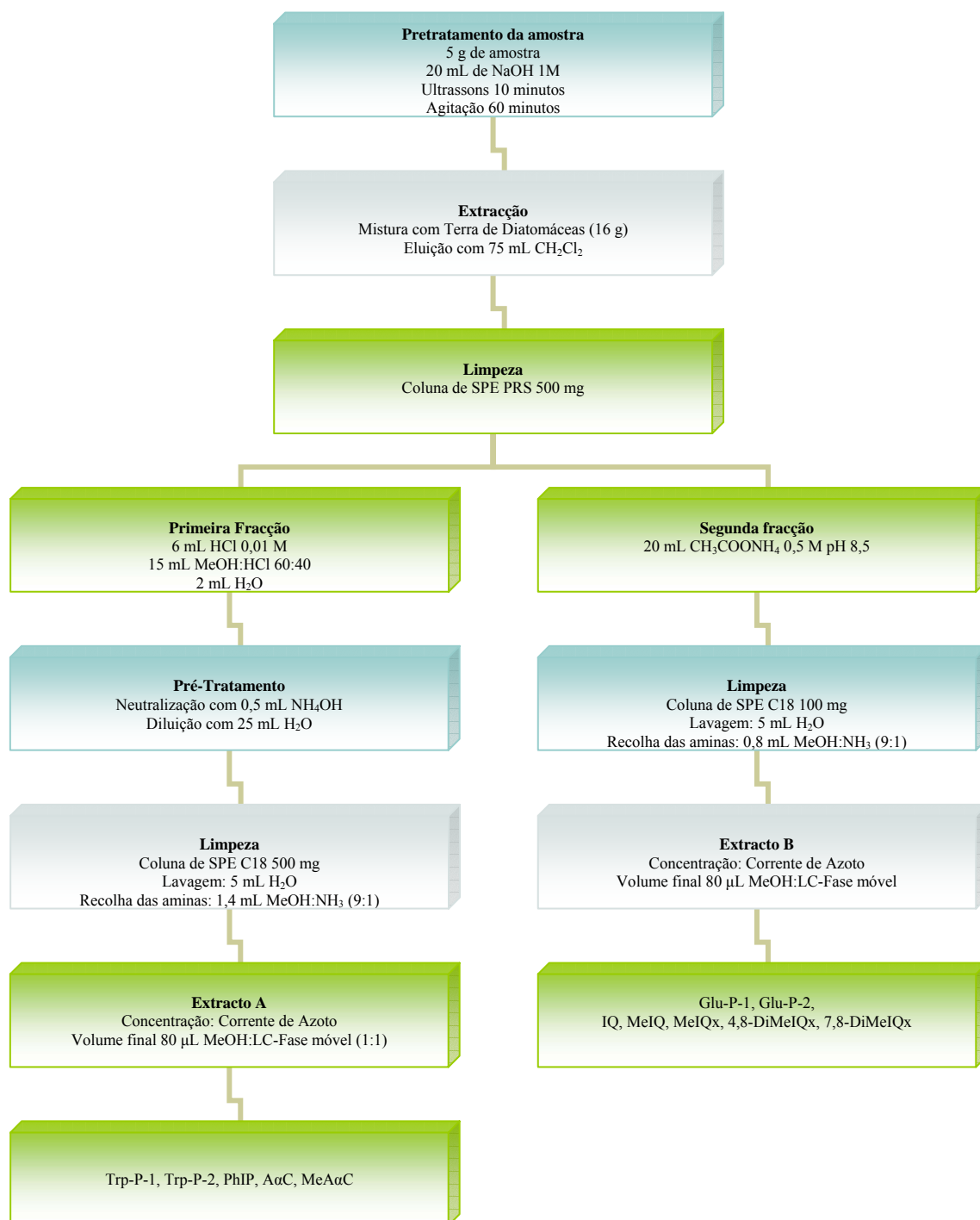


Figura 14. Esquema sequencial dos passos extractivos para obtenção de AAHs a partir de uma amostra de peixe.

1.6. Condições cromatográficas

Na fase móvel utilizaram-se como solventes: A – 0,01 M de trietilamina pH 3,2 ajustado com ácido fosfórico, B- igual ao solvente A mas o

pH ajustado a 3,6 e C -. Acetonitrilo. O programa para a separação das AAHs está indicado na Tabela 10.

Tabela 10. Programa do Gradiente

Tempo (minutos)	Solvente A (%)	Solvente B (%)	Solvente C (%)
0	95	0	5
10	85	0	15
10,1	0	85	15
20	0	75	25
30	0	45	55
30,1	45	0	55
55	95	0	5
60	95	0	5

As separações foram realizadas à temperatura ambiente.

A detecção foi feita por díodos e fluorescência. No detector de fluorescência o comprimento de onda de excitação foi de 307 nm e o de emissão de 370 nm.

1.7. Identificação e quantificação das AAHs

Para identificar as AAHs comparou-se o tempo de retenção dos picos cromatográficos obtidos com o tempo de retenção dos padrões das AAHs. Procedeu-se também à adição, nas amostras, de uma determinada quantidade de AAHs padrão, de forma a verificar se ocorria um aumento da área do pico cromatográfico (o que indicava que o pico cromatográfico obtido era a AAH padrão), ou se aparecia um novo pico cromatográfico (o que significava que o pico cromatográfico obtido não era a AAH em questão). O detector de díodos também foi útil para confirmar a identidade dos compostos em estudo. O software usado permite a correlação ponto a ponto entre o espectro dos picos das amostras e os espectros dos padrões das AAHs que tinham sido previamente guardados, assim como, a avaliação do grau de pureza dos picos comparando os espectros em diversos pontos do pico cromatográfico, como por exemplo, na subida, no ápice e na descida. Este

cálculo fornece um dado extra, pois permite saber se há ou não interferentes a eluir ao mesmo tempo que as AAHs. A utilização de dois detectores em série, baseados em princípios diferentes, tais como, díodos e fluorescência também foi útil para a confirmação da identidade das AAHs.

Efectuaram-se ensaios de recuperação para avaliar a eficiência do procedimento analítico. Deste modo, foram determinadas as percentagens de recuperação relativas a cada uma das aminas em estudo, na matriz do peixe. A percentagem de recuperação diz respeito à relação percentual entre o resultado experimental, após análise de uma amostra fortificada com uma quantidade conhecida de substância em análise, e o valor teórico da quantidade adicionada.

O complexo método extractivo das AAHs implica perdas e baixas percentagens de recuperação, deste modo, a quantificação das AAHs efectuou-se pelo método de adição padrão, que consiste na adição de quantidades conhecidas dos compostos a analisar a quantidades conhecidas de amostra. As quantidades de amostra devem ser sempre as mesmas. As áreas dos picos cromatográficos obtidos são representadas em função das concentrações de AAHs adicionadas às amostras, construindo-se uma curva de calibração. O ponto onde a curva corta o eixo das ordenadas corresponde à área do pico na amostra sem adição de padrão. A extrapolação das leituras forneceu o valor da concentração das AAHs nas amostras (Figura 15).

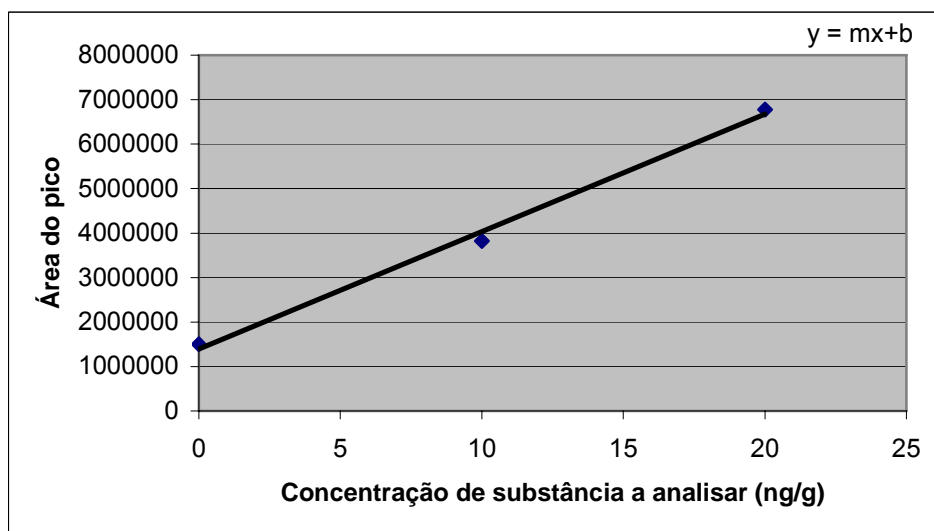


Figura 15. Recta obtida pelo método da adição padrão para a espécie a analisar.

Efectuou-se a adição de 25 e 50 ng da solução metanólica dos padrões IQ, MeIQx, 4,8-DiMeIQx e Trp-P-1 e de 50 e 100 ng dos padrões Glu-P-1, Trp-P-2, PhIP, AαC e MeAαC, antes da realização da extracção (Tabela 11). Utilizou-se o mesmo procedimento de extracção para as amostras fortificadas e não fortificadas. As restantes AAHs não foram adicionadas porque de acordo com a literatura não são vulgarmente detectadas na carne e peixe processados pelo calor (Jägerstad *et al.*, 1998 Murkovic, 2004), e também não foram detectadas nas amostras de peixe em estudo.

Tabela 11. Quantidade adicionada de padrões às amostras fortificadas

Quantidade (ng/g)	Quantidade Adicionada (ng)	Padrões	Nome
5	25	IQ, MeIQx, 4,8-DiMeIQx e Trp-P-1 Glu-P-1, Trp-P-2, PhIP, AαC e MeAαC	Adição de Padrão 1
10	50		
10	50	IQ, MeIQx, 4,8-DiMeIQx e Trp-P-1 Glu-P-1, Trp-P-2, PhIP, AαC e MeAαC	Adição de Padrão 2
20	100		

1.8. Análise estatística

Os resultados obtidos foram sujeito a One-way ANOVA utilizando o programa SPSS para Windows, versão 16 (SPSS, Chicago IL, USA).

2. Resultados e Discussão

2.1. Quantificação das AAHs em peixe grelhado: Validação do método analítico

As AAHs apresentam um espectro de UV característico e elevada absorvidade molar (ϵ), o que permite a sua detecção e quantificação com detector de díodos. As Figuras 16-19 são espectros de absorvância típicos de

algumas aminas que permitem a sua identificação. Adicionalmente, as AAHs menos polares e o PhIP apresentam fluorescência em solventes polares, podendo ser detectadas por fluorescência.

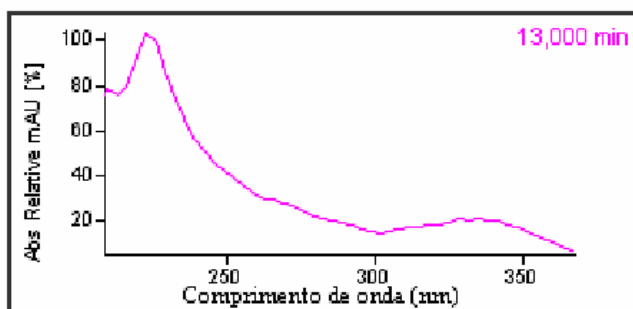


Figura 16. Espectro de UV típico da Glu-P-1 (tempo de retenção 13 minutos).

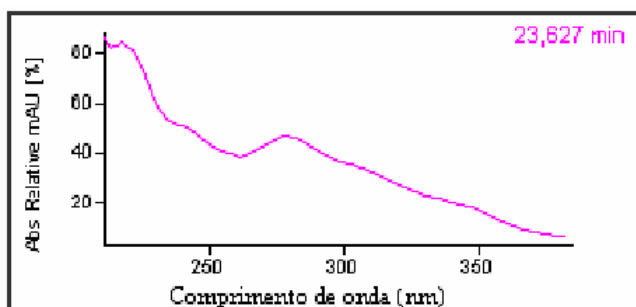


Figura 17. Espectro de UV típico da PhIP (tempo de retenção 23,627 minutos).

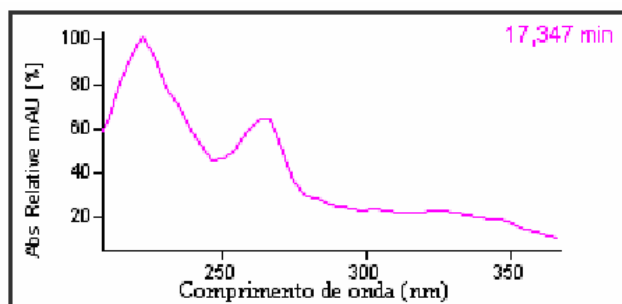


Figura 18. Espectro de UV típico da 4,8-DiMeIQx (tempo de retenção 17,347 minutos).

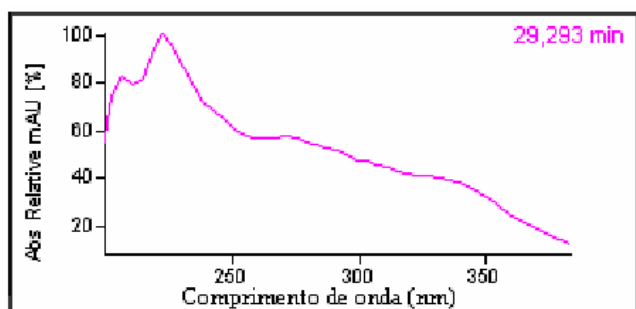


Figura 19. Espectro de UV típico da AaC (tempo de retenção 29,293 minutos).

A Figura 20 apresenta um cromatograma típico obtido através da injeção de uma solução padrão de 1000 ng/mL com 14 AAHs e com detector de díodos ($\lambda = 263$ nm).

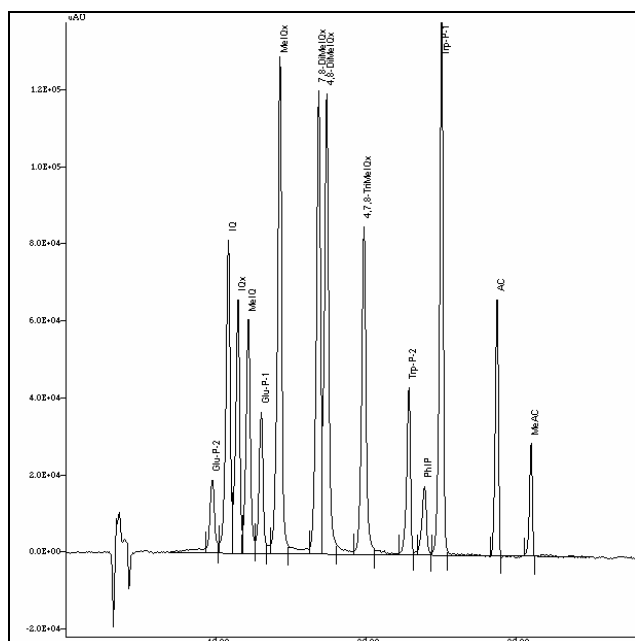


Figura 20. Cromatograma típico de uma injeção de uma mistura de 14 padrões de AAHs, com concentração de 1000 ng/mL e detecção por díodos ($\lambda = 263$ nm).

A Figura 21 apresenta um cromatograma típico obtido através da injeção de uma solução padrão de 1000 ng/mL, com detecção por fluorescência (307 nm de excitação e 370 nm de emissão).

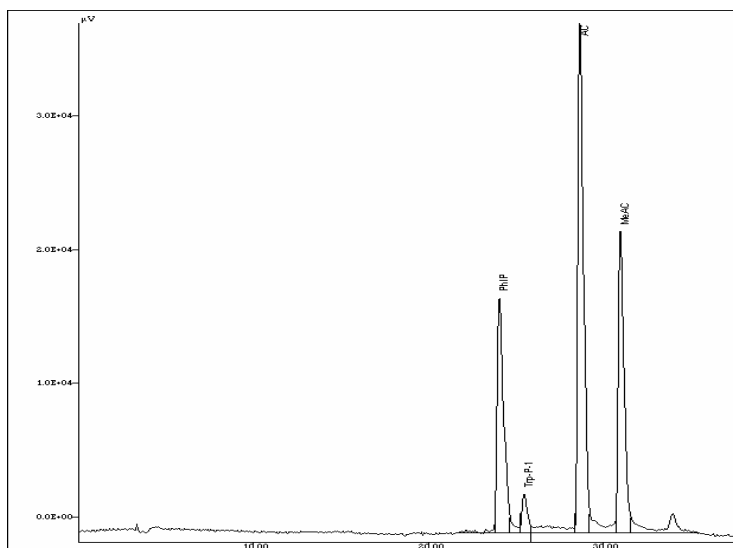


Figura 21. Cromatograma típico de uma injeção de uma mistura de padrões de AAHs, com uma concentração de 50 ng/mL, detecção por fluorescência (λ de 307nm de excitação e 370nm de emissão).

As curvas de calibração foram calculadas a partir da área de pico em relação à concentração de cada AAH. As curvas foram ajustadas para uma função linear, obtendo-se coeficientes de regressão (r) superiores a 0,9955. Os limites de detecção, baseados num sinal:ruído de 3:1, foram determinados com soluções padrão e os valores obtidos apresentam-se na Tabela 12.

Tabela 12. Parâmetros das curvas de calibração e limites de detecção determinados, avaliados pelo método do padrão externo.

AAH	Intervalo de Concentração (ng/mL)	Declive (unidade área /ng)	r	Limite de detecção (ng)
Glu-P-2 ¹	200 – 2500	3.4x10 ⁴	0.9983	0.4
IQ ¹	100 - 1000	1.7x10 ⁵	0.9963	0.2
IQx ¹	100 – 1000	1.1x10 ⁵	0.9993	0.2
MeIQx ¹	30 – 1000	3.2x10 ⁵	0.9993	0.06
Glu-P-1 ¹	200 – 2500	5.9x10 ⁴	0.9987	0.4
MeIQ ¹	100 – 1000	1.1x10 ⁵	0.9955	0.2
7,8-DiMeIQx ¹	30 – 1000	3.0x10 ⁵	0.9985	0.06
4,8-DiMeIQx ¹	30 - 1000	3.0x10 ⁵	0.9988	0.06
4,7,8-TriMeIQx ¹	100 – 1000	1.1x10 ⁵	0.9955	0.2
Trp-P-2 ¹	100 – 1000	1.7x10 ⁵	0.9991	0.2
PhIP ²	1 – 75	7245,1	0,9986	0.02
Trp-P-1 ²	10 – 75	875,94	0,9945	0.06
AαC ²	1 – 75	13731	0,9987	0.02
MeAαC ²	1 – 75	7631,8	0,9992	0.02

¹ Detecção por díodos, para λ de 263 nm.

² Detecção por fluorescência, para λ de 307 nm de excitação e 370 nm de emissão.

Os resultados obtidos na avaliação das percentagens de recuperação relativas a cada uma das aminos apresentam-se na Tabela 13.

Os valores de percentagens de recuperação obtidos são comparáveis aos encontrados na literatura para amostra de peixe (Gross e Gruter, 1992, Oz *et al.*, 2007). Diversos autores também referem baixas percentagens de recuperação para a análise de AAHs em carne (Messner e Murkovic, 2004, Knize *et al.*, 1995).

A presença de macromoléculas no músculo de peixe, tais como os lípidos e proteínas, originam uma baixa eficiência de extracção das HAAs. Isto porque as macromoléculas para além de interagirem com as espécies a analisar, também podem modificar a selectividade dos diferentes passos de extracção e purificação.

Tabela 13. Valores de percentagem de recuperação para cada uma das AAHs.

AAHs	Concentração adicionada (ng/g)	Concentração detectada (ng/g)	%recuperação
Glu-P-2	1000	600	60±0,03
IQ	500	31	62±0,02
MelQ	500	255	51±0,04
Glu-P-1	1000	600	60±0,03
MelQx	500	325	65±0,05
7,8-DiMeIQx	500	330	66±0,04
4,8-DiMeIQx	500	335	67±0,06
TriMeIQx	500	315	63±0,06
Trp-P-2	1000	230	23±0,01
PhIP	1000	230	23±0,01
Trp-P-1	500	155	31±0,06
AαC	1000	250	25±0,01
MeAαC	1000	320	32±0,00

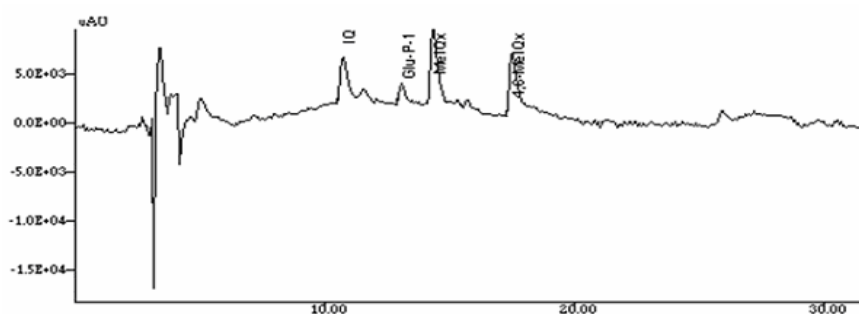
Os limites de detecção (LOD) foram avaliados para as AAHs em amostras reais, tendo em consideração uma razão sinal:ruído de 3:1. Esta avaliação foi realizada com adição de teores muito baixos de AAHs, a amostras pouco processadas (3 minutos), nas quais não tinham sido detectadas. No que respeita ao limite de detecção este foi cerca de 0,5 ng/g para o IQ, MelQ, 7,8-DiMeIQx, 4,8-DiMeIQx, TriMeIQx. Inferior a 0,5 ng/g para PhIP, Trp-P-1, AαC, MeAαC e entre 0,5 and 1,5 ng/g para o Glu-P-2, IQx, MelQx, Glu-P-1, Trp-P-2. Os valores obtidos foram concordantes com os valores descritos na literatura (Gross e Grutter, 1992, Karamanos e Tsegenidis., 1996; Oz *et al.*, 2007).

2.2.Quantificação das AAHs em sardinha grelhada

Sardinha grelhada durante 5 minutos – “mal passadas”

A Figura 22 diz respeito aos cromatogramas de AAHs da 2ª fracção (polares) obtidos para o extracto de uma amostra fortificada (a) e para o extracto de uma amostra não fortificada (b), de sardinha grelhada durante 5 minutos. As aminas IQ, Glu-P-1, MeIQx e 4.8-DiMeIQx estão perfeitamente identificadas no cromatograma (a), em contraste com o (b). Este último cromatograma foi obtido de uma amostra de sardinha grelhada, nas mesmas condições mas sem a adição de padrão e, como se pode verificar, não se identificam quaisquer picos de AAHs. Deste modo, estas aminas não foram identificadas nas sardinhas pouco assadas.

(a)



(b)

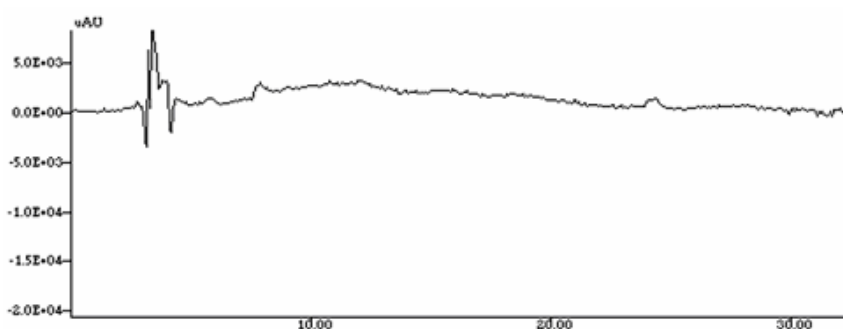
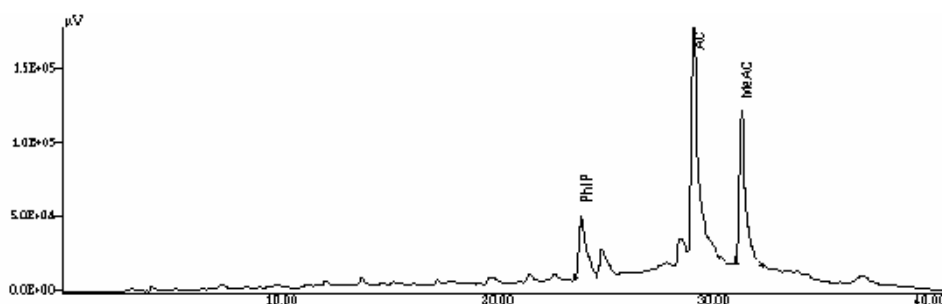


Figura 22. Cromatogramas das AAHs 2ª fracção (polares) obtidos a partir de sardinhas grelhadas durante 5 minutos. Detecção por DAD. a) extracto fortificado (com adição padrão de 10 µl). b) extracto sem adição padrão.

A Figura 23 diz respeito aos cromatogramas das aminas da 1ª fracção (menos polares), encontradas em extractos de sardinhas grelhadas durante 5 minutos. O cromatograma (a) diz respeito a um extracto fortificado, onde se pode identificar a PhIP, a AαC e a MeAαC. No cromatograma (b), com muitos picos interferentes, não se conseguem identificar quaisquer aminas.

(a)



(b)

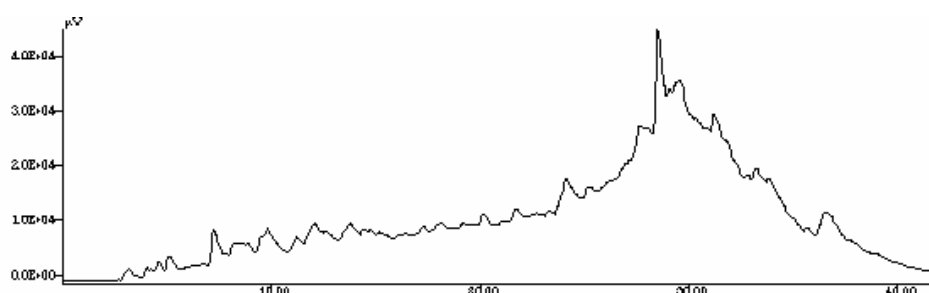


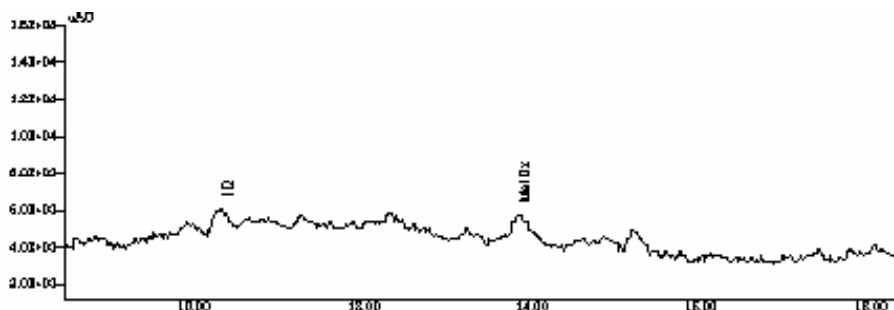
Figura 23. Cromatogramas das AAHs 1ª fracção (menos polares) obtidos a partir de sardinhas grelhadas durante 5 minutos. Detecção por fluorescência. a) extracto fortificado (com adição padrão de 10 µl) b) extracto sem adição padrão.

Sardinha grelhada durante 7 minutos – “bem passadas”

A Figuras 24 diz respeito aos cromatogramas obtidos para os extractos de sardinha grelhada durante 7 minutos. No cromatograma de um extracto não fortificado de sardinhas grelhadas (a), apenas é possível identificar as aminas IQ e MeIQx. Outras aminas da 2ª fracção (polares), como a Glu-P-1 e a 4,8-DiMeIQx, estão identificadas somente no cromatograma (b),

que diz respeito a um extracto fortificado. Estas aminas não foram detectadas nas amostras de sardinha.

(a)



(b)

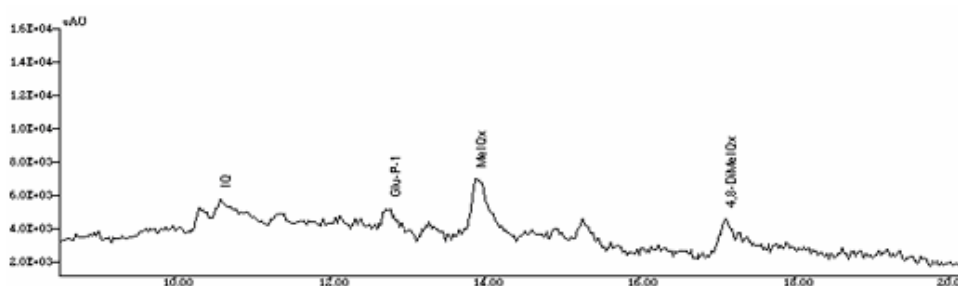
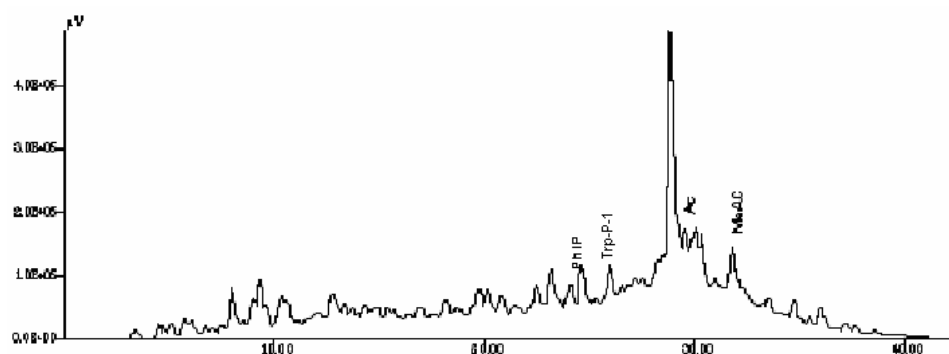


Figura 24. Cromatogramas de AAHs de 2ª fracção (polares) obtidos a partir de um extracto de sardinhas grelhadas durante 7 minutos. Detecção por DAD. (a) extracto sem adição padrão (b) extracto fortificado (com adição padrão de 10 µl).

A Figura 25 (a) é um cromatograma de aminas de 1ª fracção, em que os picos correspondentes às aminas PhIP, Trp-P-1, AαC e a MeAαC estão perfeitamente identificados. Este cromatograma é relativo a um extracto não fortificado obtido a partir de sardinhas grelhadas durante 7 minutos. No cromatograma (b) da Figura 25 é possível confirmar a identificação das mesmas aminas, sendo que se trata de um extracto fortificado da mesma amostra.

(a)



(b)

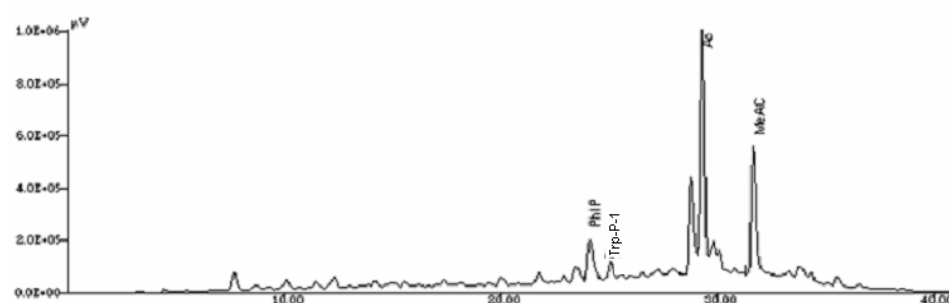
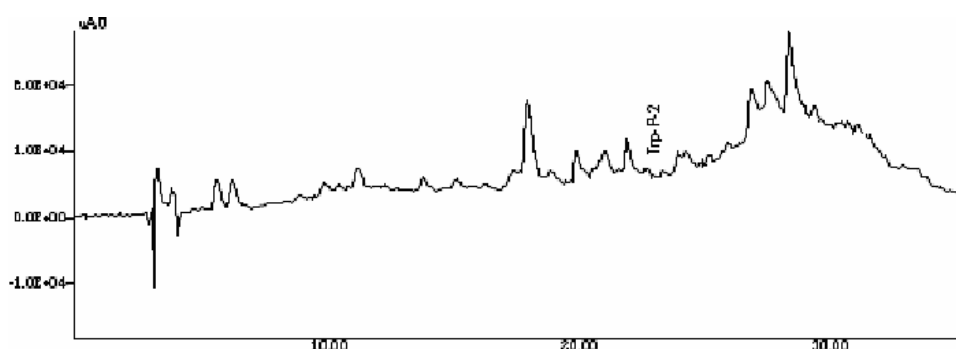


Figura 25. Cromatogramas de AAHs de 1ª fracção (menos polares) obtidos a partir de um extracto de sardinhas grelhadas durante 7 minutos. Detecção por fluorescência. (a) extracto não fortificado. (b) extracto fortificado (com adição padrão de 10 µl).

As aminas PhIP, Trp-P-1, AaC e MeAaC, são as aminas de 1ª fracção que se conseguem detectar por fluorescência. A amina Trp-P-2 é também uma amina de 1ª fracção, mas nas condições de detecção usadas apenas se detecta por díodos. Nos cromatogramas (a) e (b) da Figura 26 é possível verificar a sua presença num extracto de sardinha não fortificado e num extracto fortificado, respectivamente.

(a)



(b)

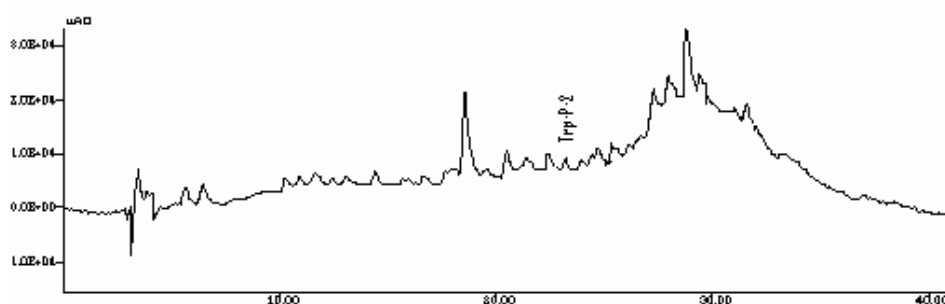


Figura 26. Cromatogramas de AAHs de 1ª fracção (menos polares) obtidos a partir de um extracto de sardinhas grelhadas durante 7 minutos. Detecção por DAD de Trp-P-2.(a) extracto não fortificado. (b) extracto fortificado (com adição padrão de 10 µl).

Recorrendo às rectas de calibração (Área vs Concentração) conseguidas a partir dos cromatogramas obtidos, foi possível quantificar algumas das aminas em estudo. Assim, as aminas encontradas nas amostras de sardinhas grelhadas durante 5 e 7 minutos, e respectivas concentrações (em ng/g), estão apresentadas na Tabela 14. Nas sardinhas “mal-passadas” não são detectadas nenhuma das aminas pesquisadas. No entanto, nas sardinhas grelhadas durante 7 minutos verifica-se que as aminas pirolíticas são as mais abundantes, neste tipo de peixe. Os níveis de AαC atingem os 17,7 ng/g, os níveis de MeαAC chegam aos 10,6 ng/g e os níveis de Trp-P-2 situam-se próximos dos 8 ng/g. Por outro lado, as aminas MeIQ, 7,8-DiMeIQx,

4,8-DiMeIQx, a Glu-P-1 e a Glu-P-2 não foram detectadas nas sardinhas “bem passadas”.

Tabela 14. Teores de AAHs em sardinhas grelhadas no carvão (expressos em ng/g).

AAHs	Sardinha A	Sardinha B	Sardinha C	Sardinha D
IQ	n.d.	0,9	n.d.	1,8.
MelQ	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
MelQx	n.d.	2,2	n.d.	4,4
4,8-DiMeIQx	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
7,8-DiMeIQx	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Glu-P-1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Glu-P-2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Trp-P-1	n.d.	1,8	n.d.	n.d.
Trp-P-2	n.d.	8,2	n.d.	n.d.
PhIP	n.d.	6,5	n.d.	3,3
AaC	n.d.	17,7	n.d.	2,0
MeAaC	n.d.	10,6	n.d.	n.d.
IQx	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
4,7,8-TriMeIQx	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

Nota: n.d. – não detectável

Resultados obtidos por fluorescência para PhIP, MeAaC, Trp-P-1 e AaC e por díodos para as restantes.

O tempo de processamento das sardinhas foi determinante na formação das AAHs. Nas Sardinhas A, grelhadas durante 5 minutos de cada lado, a 280 °C, não foram detectadas AAHs. No entanto, nas Sardinhas B, submetidas a 7 minutos de grelha de cada lado, foi possível detectar e quantificar vários tipos de AAHs. Em relação às amins que se formam a temperaturas mais baixas (térmicas), foi possível detectar a MelQx e a IQ (2,2 e 0,9 ng/g, respectivamente), formadas por reacções Maillard envolvendo a creatin(in)a e a glicina. Estas, por serem as que mais frequentemente se encontram nos alimentos processados, são as mais estudadas. Já em 1981, Kasai *et al.*, tinham isolado, a IQ (descrita pelos mesmos autores como um potente mutagénico), a partir de um extracto de sardinhas grelhadas em

condições domésticas. Posteriormente, Yamaizumi *et al.*, 1986, quantificaram por LC/MS, utilizando padrões deuterados, IQ e MeIQ em sardinhas grelhadas. Os autores referem teores de 4,9 e 16,6 ng/g, respectivamente (Tabela 15). No entanto, não referem a presença de MeIQx, que foi detectada e quantificada nas sardinhas B.

Na Tabela 15 foram compilados resultados da literatura respeitantes ao teor de AAHs térmicas em sardinhas e outros peixes. É possível observar diferentes perfis qualitativos e quantitativos no que respeita à composição em AAHs nas amostras de peixe descritas pelos diferentes autores. Porém, é de realçar, que é difícil a comparação dos resultados obtidos pelos diversos investigadores, porque estes dependem fortemente do processo de purificação das amostras, assim como, do método de detecção usado no HPLC. Recentemente, Oz *et al.*, 2007 determinaram o teor de AAHs térmicas em duas espécies de trutas grelhadas, tendo-se obtido resultados diferentes para cada uma delas: na truta “castanha” detectou-se IQ e 4,8-DiMeIQx (0,12 e 0,02 ng/g, respectivamente); na truta “arco-íris”, apenas se detectou 4,8-DiMeIQx, em quantidades próximas das da outra espécie. Ao contrário do que acontece na maioria dos outros peixes processados (Tabela 15), em nenhuma destas espécies de truta se detectou IQ e PhIP. Esta última amina, resultante da condensação alcoólica de fenilacetilaldeído (que se forma por degradação térmica da fenilalanina) é aquela que se encontra na maioria dos alimentos proteicos processados incluindo o peixe (Skog *et al.*, 1997). No entanto, nas Sardinhas B foi possível encontrar PhIP em níveis próximos dos 7 ng/g, abaixo dos níveis de AαC.

Tabela 15. Teores de AAHs térmicas encontradas em alguns peixes processados.

Tipo de peixe	Processamento culinário	Método detecção	AAHs	Fonte bibliográfica
Sardinha	Grelhada	LC/MS- padrões deuterados	IQ, MeIQ – 4,9 e 16,6 ng/g, respectivamente	Yamaizumi <i>et al.</i> , 1986.
Enguia	Assado	HPLC-UV	MeIQx , 7,8-DiMeIQx– 1,1 e 5,3 ng/g, respectivamente	Lee e Tsai, 1991.
Bacalhau	Frito	HPLC-UV	IQ, MeIQ, MeIQx, 4,8-DiMeIQx, PHIP – 0,16; 0,03; 6,44; 0,10 e 69,2 ng/g, respectivamente	Wakabayashi <i>et al.</i> , 1993.
Arenque	Frito	HPLC/UV	MeIQx, PhIP – 0,2 ng/g e 0,07-0,3, respectivamente	Skog <i>et al.</i> , 1997.
Truta “castanha” e “arco- íris”	Grelhadas	HPLC/UV/DAD	IQ, 4,8-DiMeIQx – 0,12 e 0,02 ng/g, respectivamente (“castanha”); 4,8-DiMeIQx – 0,02 ng/g (“arco-íris”)	Oz <i>et al.</i> , 2007

No que respeita às aminas pirolíticas, foram detectadas nas sardinhas B, as γ carbolinas – Trp-P-2 e Trp-P-1 – e as α carbolinas - A α C e MeA α C. Como já foi referido, são aminas que se formam geralmente, acima dos 300°C, por pirólise de aminoácidos como o triptofano. No entanto, estas aminas têm vindo a ser detectadas em alimentos processados em condições domésticas. A Trp-P-1 e Trp-P-2, foram detectadas, não só em alimentos cozinhados a temperaturas próximas dos 225°C (entre os 0,5 e os 7,4 ng/g) como também em molhos de carnes obtidos a temperaturas abaixo dos 200°C (Skog *et al.*, 1997). Em 1980, estes compostos tinham sido quantificados, nas sardinhas grelhadas, por Yamaizumi *et al.*, em níveis próximos dos 13 ng/g. Estes teores são mais elevados que os encontrados nas Sardinhas B (1,8 e 8,2 ng/g, respectivamente para Trp-P-1 e Trp-P-2).

Ao contrário do que acontece na maioria das carnes (excepto no frango, Tabela 6 da parte I), os níveis de AαC e de MeAαC, obtidos para as sardinhas B, superam os níveis de MeIQx, atingindo teores de 17 e 10 ng/g, respectivamente. Estas aminas, por serem as menos abundantes nas carnes fritas e assadas, não têm merecido muita atenção por parte da comunidade científica. No entanto, Knize *et al.*, 1996, ao estudarem a formação de AAHs durante a confecção de alimentos proteicos, verificaram a existência de um teor elevado de AαC nos hambúrgueres grelhados no carvão, enquanto que, nos hambúrgueres grelhados por outros métodos, não foi possível detectar esta amina. No que concerne ao teor de AAHs no peixe processado existem ainda poucos estudos, principalmente no que se refere às aminas pirolíticas, que, pelos motivos já referidos, são as menos mencionadas na literatura. Porém, a ter em conta os teores encontrados nas Sardinhas B, mais estudos deveriam ser realizados para conhecer a ingestão diária destas aminas na dieta e potenciais efeitos nefastos.

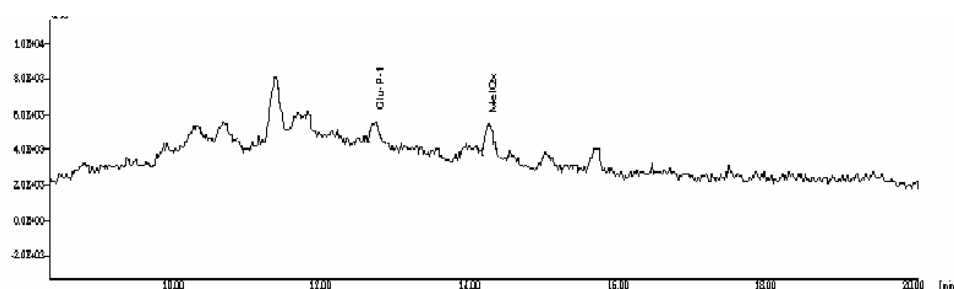
Na tentativa de estimar os níveis de ingestão de AAHs numa refeição de sardinhas grelhadas, procedeu-se à análise de sardinhas cozinhadas até um grau de cocção médio, utilizando diferentes condições domésticas: Sardinhas C – grelhadas mais afastadas do carvão e D – grelhadas mais próximas do carvão. Assim, foi possível verificar que nas sardinhas C não se formaram AAHs em níveis detectáveis, no entanto, nas sardinhas D foi possível detectar IQ, MeIQx, PhIP e AαC, com níveis de 1,8; 4,4, 3,3 e 2,0 ng/g, respectivamente. Deste modo, verificamos que, dependendo das condições de processamento, os níveis de ingestão podem ser muito variáveis. Estes resultados indicam que, mesmo para um grau de cocção semelhante, a distância à fonte de calor é determinante no nível de AAHs encontrado nos alimentos processados, sendo este, também, um factor que importa controlar durante a confecção e preparação dos alimentos.

2.3.Quantificação das AAHs em salmão grelhado

Salmão grelhado perto do carvão (10 cm)

A Figura 27 apresenta os cromatogramas de AAHs de 2ª fracção, obtidos para um extracto não fortificado (a) e outro extracto fortificado (b) de salmão grelhado próximo do carvão (Postas A). Em ambos os casos é possível identificar os picos da aminos Glu-P-1 e MeIQx (2ª fracção).

(a)



(b)

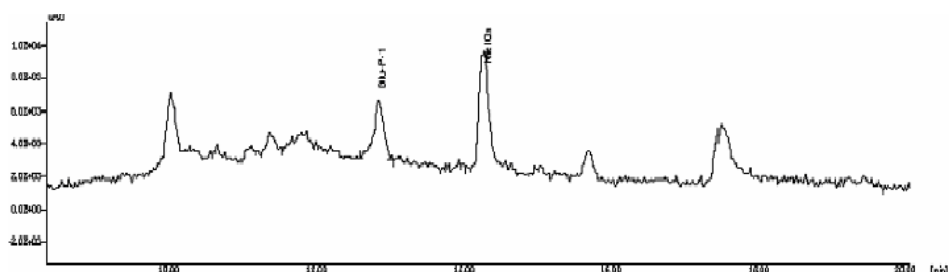
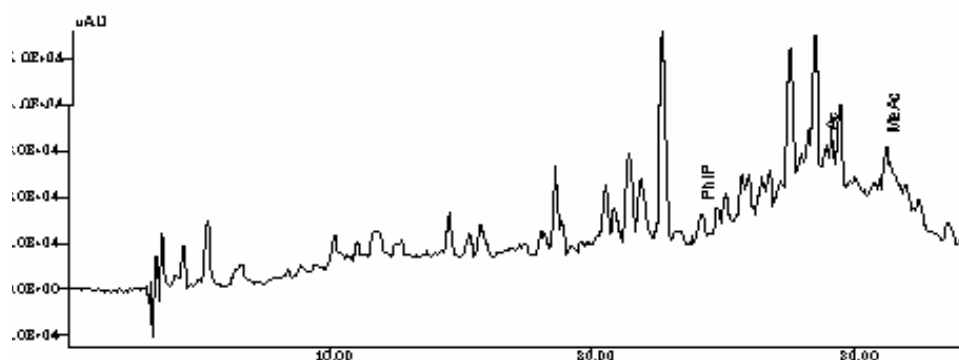


Figura 27. Cromatogramas de AAHs de 2ª fracção (polares), obtidos a partir de um extracto de salmão grelhado próximo do carvão. Detecção por DAD. (a) extracto não fortificado. (b) extracto fortificado (adição padrão de 10µl).

As aminos identificadas nos cromatogramas da Figura 28, são aminos de 1ª fracção (menos polares): PhIP, AαC e MeAαC. A Figura 28 (a) corresponde a um extracto de salmão grelhado não fortificado e a Figura 28 (b) a um extracto fortificado.

(a)



(b)

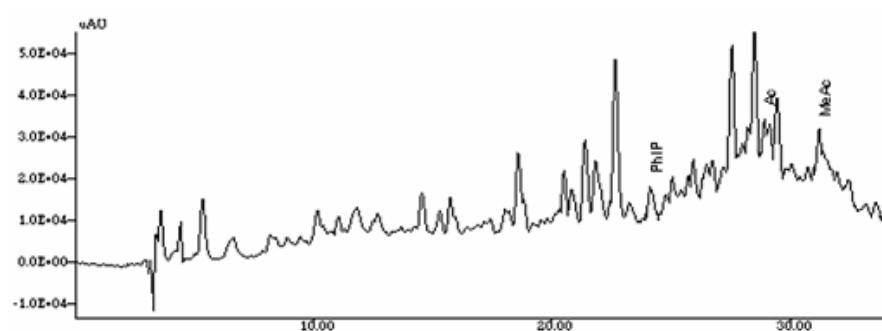
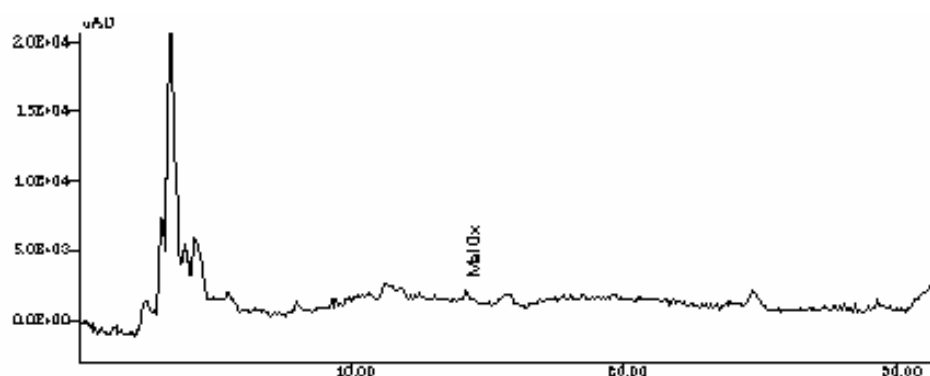


Figura 28. Cromatogramas de AAHs de 1ª fracção (menos polares), obtidos a partir de um extracto de salmão grelhado perto do carvão. Detecção por Fluorescência.(a) extracto não fortificado. (b) extracto fortificado (adição padrão de 10µl).

Salmão grelhado a 25 cm do carvão

A Figura 29 (a) representa um cromatograma obtido após extracção e análise de uma amostra de salmão grelhado a 25 cm do carvão (Postas B). Apenas é possível identificar o pico característico da amina MeIQx. A Figura 30 (b) diz respeito a um cromatograma de um extracto fortificado da mesma amostra, em que se identificam, além da MeIQx, as aminas IQ, Glu-P-1 e a 4,8-DiMeIQx.

(a)



(b)

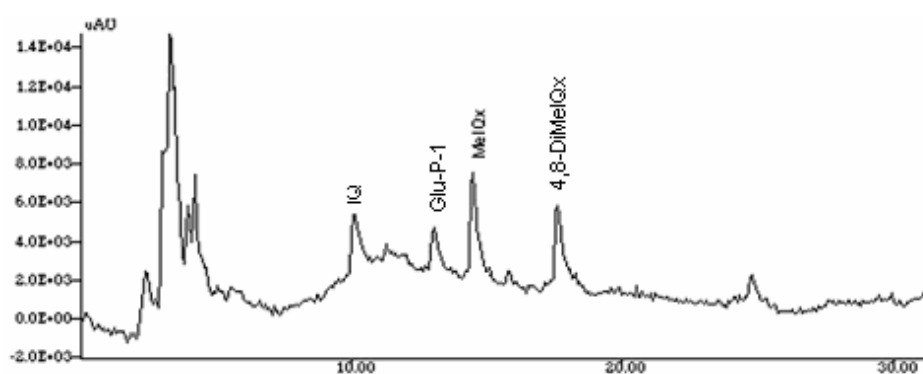
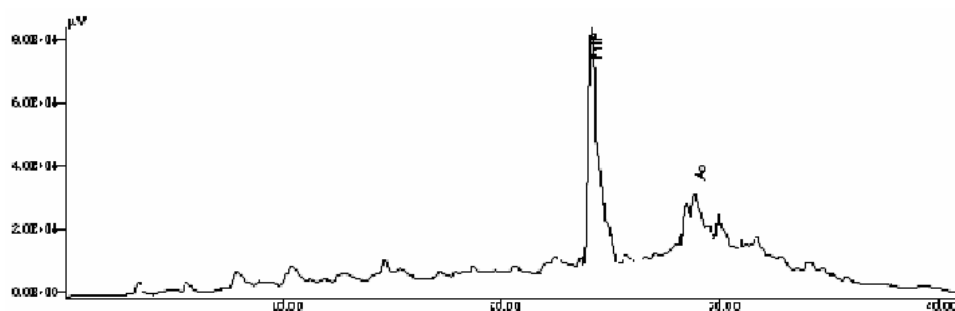


Figura 29. Cromatogramas de AAHs de 2ª fracção (polares), obtidos a partir de um extracto de salmão grelhado a 15 cm do carvão. Detecção por DAD. (a) extracto não fortificado. (b) extracto fortificado (adição padrão de 10µl).

Na Figura 30 é possível identificar as aminas menos polares, como sejam a PhIP, a AαC e a MeAαC. O cromatograma (a) diz respeito a uma amostra não fortificada, de salmão grelhado a 25 cm da grelha, e o cromatograma (b) diz respeito à mesma amostra fortificada.

(a)



(b)

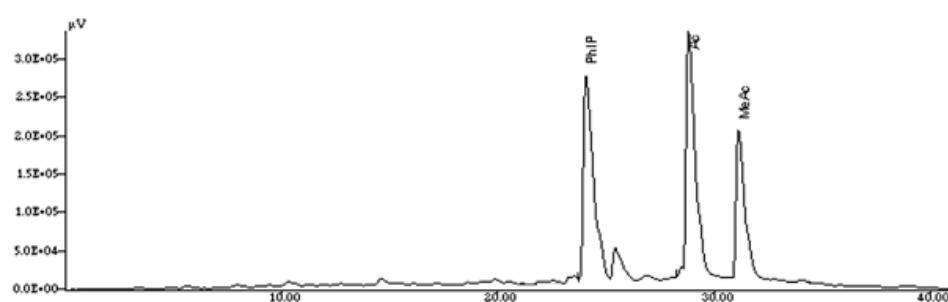
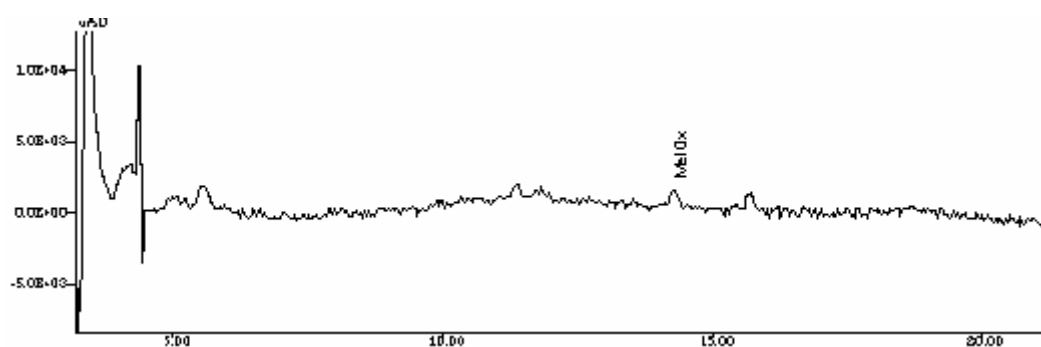


Figura 30. Cromatogramas de AAHs de 1ª fracção (menos polares), obtidos a partir de um extracto de salmão grelhado a 15 cm do carvão. Detecção por Fluorescência. (a) extracto não fortificado. (b) extracto fortificado (adição padrão de 10μl).

Salmão grelhado na grelha eléctrica

Os cromatogramas da Figura 31 foram os obtidos para as AAHs polares extraídas do salmão grelhado numa grelha eléctrica (Postas C). Em relação ao extracto não fortificado (a), apenas a MeIQx foi passível de detectar. No extracto fortificado, já foi possível detectar as aminas IQ, Glu-P-1, MeIQX e 4,8-DiMeIQx (b).

(a)



(b)

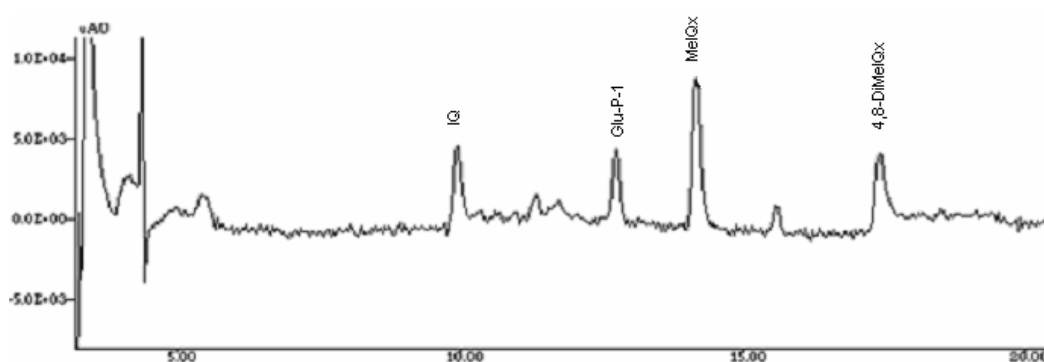
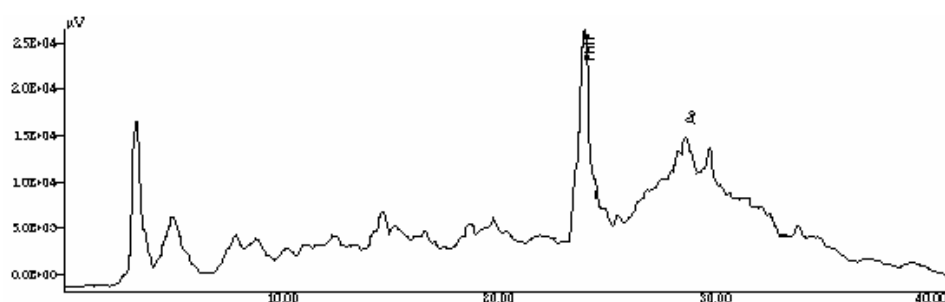


Figura 31. Cromatogramas de AAHs de 2ª fracção (polares), obtidos a partir de um extracto de salmão grelhado no grelhador eléctrico. Detecção por DAD. (a) extracto não fortificado. (b) extracto fortificado (adição padrão de 10µl).

No que respeita às aminas de 1ª fracção (menos polares), mais uma vez, foram identificadas e quantificadas a PhIP, AαC e MeAαC. Na Figura 32, os cromatogramas (a) e (b) referem-se a extractos - fortificado e não fortificado, respectivamente - de salmão grelhado numa grelha eléctrica.

(a)



(b)

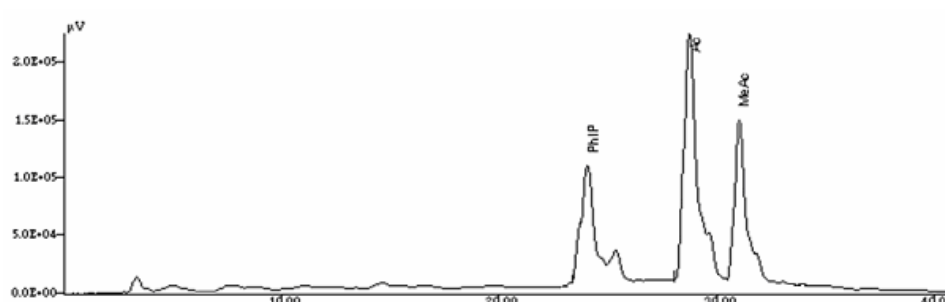


Figura 32. Cromatogramas de AAHs de 1ª fracção (menos polares), obtidos a partir de um extracto de salmão grelhado em grelhador eléctrico. Detecção por Fluorescência. (a) extracto não fortificado. (b) extracto fortificado (adição padrão de 10μl).

A Tabela 16 refere-se aos resultados obtidos, para o salmão grelhado, após análise e detecção por HPLC-Fluorescência/Díodos. Apresentam-se os valores quantificados na crosta e na posta total. É possível verificar que a PhIP é a amina mais abundante para qualquer um dos três tipos de processamento do salmão. A AαC e a MeIQx também foram detectadas nos três métodos de processamento mas a níveis diferentes. A Glu-P-1 e a MeAαC são também quantificadas no salmão grelhado perto do carvão (Postas A), no entanto, são negligenciáveis no salmão grelhado na grelha eléctrica (Postas C). As aminas Trp-P-1, Trp-P-2, 4,8-DiMeIQx, 7,8-DiMeIQx, 4,7,8-TriMeIQx, IQx, IQ e MeIQ não foram detectadas neste peixe grelhado.

Tabela 16. Teores de AAHs no salmão grelhado (expressos em ng/g de posta de salmão).

AAHs	Postas A	Postas B	Postas C
PhIP	13±3,3 ^a	4,3±2,0 ^b	2,6±0,42 ^b
AaC	3,5±2,4 ^a	0,37±0,22 ^b	1,95±1 ^{a,b}
MeAaC	0,8±1,13 ^a	n.d. ^a	n.d. ^a
Glu-P-1	2,25±3,18 ^a	1±1,4 ^a	n.d. ^a
Glu-P-2	n.d.	n.d.	n.d.
IQ	n.d.	n.d.	n.d.
7,8-DiMeIQx	n.d.	n.d.	n.d.
4,8-DiMeIQx	n.d.	n.d.	n.d.
MeIQx	0,35±0,5 ^a	1,3±1,2 ^a	0,86±0,09 ^a
Trp-P-1	n.d.	n.d.	n.d.
Trp-P-2	n.d.	n.d.	n.d.
IQx	n.d.	n.d.	n.d.
MeIQ	n.d.	n.d.	n.d.
4,7,8-TriMeIQx	n.d.	n.d.	n.d.

Nota: n.d. – não detectável; os índices a e b indicam diferenças significativas $p < 0.05$ no teste ANOVA

Resultados obtidos por fluorescência para PhIP, Trp-P-1, MeAaC e AaC e por díodos para os restantes.

De acordo com os resultados obtidos, os níveis de AAHs formados no salmão grelhado no carvão são tanto maiores quanto maior a proximidade à fonte de calor (brasa). É possível verificar também que, no que respeita ao PhIP (a AAH mais abundante), os teores são significativamente mais elevados no salmão grelhado próximo da brasa que no salmão grelhado afastado da fonte de calor ou em grelha eléctrica. Como já foi referido, a exposição directa e próxima à fonte de calor influi na formação de AAHs. É de salientar que a temperatura ambiente próxima do carvão rondava os 300°C, enquanto que, junto da grelha eléctrica esse valor se situava à volta dos 200°C. Além do factor temperatura, outro aspecto poderá ajudar a explicar os resultados obtidos: a combustão do carvão é, por si só, responsável pela formação de AAHs, podendo aumentar os teores destas amins nos alimentos grelhados desta forma. Já em 1977, Nagao *et al.* analisaram as partículas retidas num filtro de vidro através do qual fizeram passar o fumo libertado durante a grelha de sardinhas. O teste de Ames com *Salmonella typhimurium* indicou que o potencial mutagénico dessas partículas era muito superior ao potencial mutagénico esperado para os PAHs (Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos)

e outros compostos encontrados no fumo do tabaco. Este aspecto faz supor que o fumo proveniente da combustão de carvão pode apresentar AAHs e aumentar a possibilidade de formação destas substâncias nos alimentos grelhados. As AAHs são emitidas para a atmosfera através da combustão de uma grande variedade de materiais, tais como, vegetação, madeira, petróleo e outras substâncias orgânicas. Podem ser depositadas na água dos rios, pelas poeiras ou pela chuva. Wu *et al.*, 1995, detectaram Trp-P-2, 4,8-DiMeIQx e PhIP na água da chuva recolhida durante as épocas de incêndios nas florestas no sudeste da Ásia. Manabe *et al.*, 1989, também detectaram AαC e MeAαC, Trp-P-1 e Trp-P-2 na água da chuva. Kataoka *et al.*, 1998, determinaram AAHs no fumo resultante da combustão de diferentes amostras, incluindo cigarros, lascas de madeira e borracha e confirmaram que as AAHs são emitidas para a atmosfera, através da combustão destes materiais. Adicionalmente, os sucos, que se libertam durante a grelha do peixe e que caem no carvão, por pirólise, podem originar AAHs que, sendo arrastadas pelo fumo, se depositam na superfície do alimento (Knize *et al.*, 1996).

Ao contrário dos resultados obtidos nas sardinhas, as aminas pirolíticas, Trp-P-1 e Trp-P-2, não foram detectadas em nenhuma das postas de salmão. Não obstante, as carbolinas MeAαC e AαC foram quantificadas nas postas grelhadas perto do carvão (nas postas A atingiram teores de 1,6 e 3,5 ng/g, respectivamente). Nas postas B e C não se detectou MeAαC, no entanto, os níveis de AαC são, respectivamente, de 0,37 ng/g e 1,95 ng/g. Os níveis de Glu-P-1, outra amina pirolítica, foram em média, de 2,25 ng/g no salmão grelhado próximo do carvão (Postas A) e de 1 ng/g para o salmão grelhado a 25 cm da grelha (Postas B). No entanto, no salmão grelhado na grelha eléctrica (Postas C) esta amina não foi detectada.

Os níveis de PhIP são também relevantes chegando aos 13,3 ng/g para o salmão próximo do carvão, verificando-se uma diminuição significativa deste valor para os outros dois tipos de grelha – 4,3 ng/g para o salmão grelhado no carvão a 25 cm e 2,6 ng/g para o salmão grelhado na grelha eléctrica.

No que respeita aos níveis de MeIQx, estes não apresentam diferenças significativas com o tipo de grelha, apresentando valores mais elevados no salmão grelhado a 25 cm do carvão (1,3 ng/g). No salmão

grelhado perto do carvão e no salmão grelhado na gelha eléctrica esse valor é de 0,45 e 0,86 ng/g, respectivamente.

Na Tabela 17 estão apresentados os resultados obtidos por Gross e Gruter, 1992. Estes autores pesquisaram a presença de PhIP, AαC e MelQx, no salmão confeccionado de três formas diferentes: grelhado em sertã, assado e grelhado na brasa.

Tabela 17. Teor de AAHs no salmão confeccionado por métodos de processamento diferentes. Adaptado de Gross e Gruter, 1992.

Método de processamento	MelQx (ng/g)	PhIP (ng/g)	AαC (ng/g)
Grelhado a 200°C			
3 minutos	1,4	1,7	n.d.
12 minutos	3,1	14	8
Assado a 200°C			
20 minutos	<1	n.d.	n.d.
40 minutos	3,1	5,9	n.d.
Grelhado na brasa a 270°C			
4 minutos	<1	2	2,8
6 minutos	<1	6,2	6,9
9 minutos	<1	69	73
12 minutos	<1	73	109

Os resultados variaram com o método de processamento, tempo e temperatura de confecção. O salmão grelhado na brasa foi submetido a uma temperatura de 270°C com tempos de grelha variáveis (entre os 4 e os 12 minutos). Para cada um dos tempos de grelha obteve-se diferentes teores de AAHs, assim, os valores de PhIP variaram entre os 2 e os 73 ng/g (valores para os 4 e 12 minutos de grelha, respectivamente), os valores de AαC entre os 2,8 e os 109 ng/g e os valores de MelQx abaixo de 1 ng/g. Nesse mesmo estudo, foram também analisadas amostras de salmão grelhadas na sertã (200°C), submetidas a diferentes tempos de grelha (entre os 3 e os 12 minutos), tendo-se verificado um decréscimo nos níveis de PhIP e AαC, em relação aos respectivos níveis obtidos na grelha no carvão: PhIP - 1,7 a 14 ng/g, AαC - n.d. a 8 ng/g. Pelo contrário, os níveis de MelQx são mais altos

para o salmão grelhado na sertã do que o grelhado na brasa, tendo variado, neste último caso, entre 1,4 e 3,1 ng/g (níveis para os 3 e 12 minutos de grelha, respectivamente). Os valores mais baixos de AAHs foram os obtidos para o salmão assado no forno a 200°C, por um período que variou entre os 20 e os 40 minutos. O teor de AAHs no salmão assado também aumentou com o tempo de processamento. Estes resultados corroboram a importância do tempo, da temperatura e do método de grelha na formação das AAHs. Além disso, as amins detectadas por Gross e Gruter, 1992 no salmão, foram as mesmas que as detectadas em todas as amostras do presente estudo, nomeadamente PhIP, AαC e MeIQx. No entanto, no geral, estes autores descrevem teores mais elevados para estas amins, o que deve estar relacionado com a espessura das postas de salmão, parâmetro que não foi definido pelos autores. Na Tabela 18 apresentam-se os resultados obtidos ao analisar somente a crosta das postas A, B e C. Estes valores são significativamente mais elevados do que se considerarmos a posta inteira, uma vez que, é, fundamentalmente, à superfície dos alimentos que se formam as AAHs (Knize *et al.*, 1996), por razões que têm a ver com a maior exposição desta à fonte de calor (maior temperatura) e o facto de ser, também, uma área de contacto com o fumo provindo das brasas, no caso de ser um alimento grelhado a carvão (Kataoka *et al.*, 1998).

Tabela 18. Teores de AAHs no salmão grelhado (expressos em ng/g de crosta de salmão).

	Postas A	Postas B	Postas C
PhIP	28,9±10 ^a	10,6±4,9 ^b	5,0±0,59 ^b
AaC	8,9±4,8 ^a	0,93±0,52 ^b	3,9±2,2 ^{a,b}
MeaAC	2,0±2,7 ^a	n.d. ^a	n.d. ^a
Glu-P-1	4,6±6,6 ^a	2,5±3,5 ^a	n.d. ^a
Glu-P-2	n.d.	n.d.	n.d.
IQ	n.d.	n.d.	n.d.
7,8-DiMeIQx	n.d.	n.d.	n.d.
4,8-DiMeIQx	n.d.	n.d.	n.d.
MeIQx	0,7±1,0 ^a	3,3±3,2 ^a	1,7±0,091 ^a
Trp-P-1	n.d.	n.d.	n.d.
Trp-P-2	n.d.	n.d.	n.d.
IQx	n.d.	n.d.	n.d.
MeIQ	n.d.	n.d.	n.d.
4,7,8-TriMeIQx	n.d.	n.d.	n.d.

Nota: n.d. – não detectável; os índices a e b indicam diferenças significativas $p < 0.05$ no teste ANOVA. Resultados obtidos por fluorescência para PhIP, Trp-P-1, MeaAC e AaC e as restantes por díodos.

2.4.Avaliação da ingestão de AAHs numa refeição

Comparando os níveis totais de AAHs detectadas em cada uma das amostras em estudo, verifica-se que as amostras de Sardinhas A (grelhadas durante 7 minutos) e as de Postas A de salmão (grelhadas a 10 cm do carvão) apresentam igual teor total em AAHs. Assim, se consumirmos uma refeição de, aproximadamente, 200 g (porção edível) de Sardinhas B e de Postas A de salmão o nível de ingestão de AAHs total é de, aproximadamente, 4000 ng (Figura 33). Igual quantidade de Sardinhas D (sardinhas grelhadas em condições domésticas até um grau de cocção médio, mas mais próximas da brasa) apresenta um nível total de aminos de 2300 ng. As postas de salmão B e C (grelhadas a 25 cm do carvão e na grelha eléctrica, respectivamente) apresentam níveis de AAHs muito próximos, que rondam os 1000 ng. As Sardinhas A, grelhadas durante 5 minutos, e as C, grelhadas em condições domésticas e afastadas do carvão, não apresentam níveis detectáveis de AAHs. Estes resultados demonstram o quão variável pode ser o nível de

ingestão de AAHs numa refeição, podendo variar de 4000 ng (Sardinhas B) a níveis que se aproximam dos 0 ng (Sardinhas A e C).

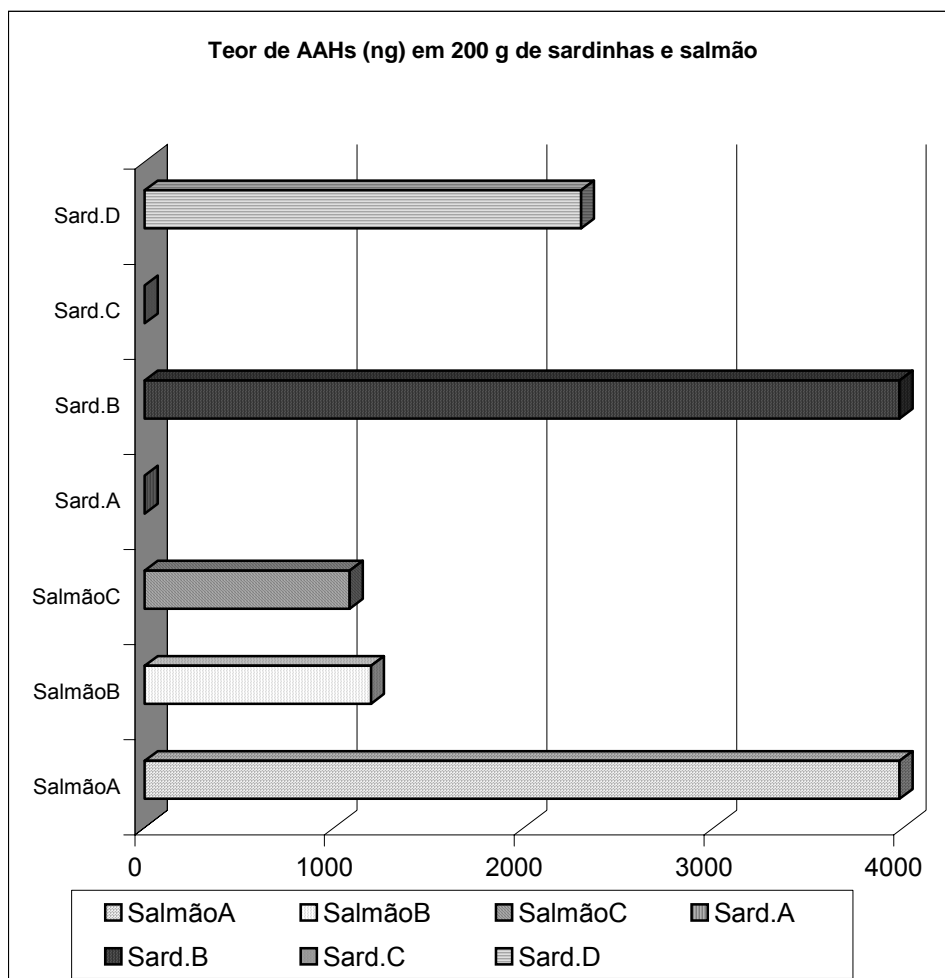


Figura 33. Teores de AAHs (ng) em 200 g de amostras de sardinha e salmão grelhados.

Comparando estes resultados com os obtidos por Knize *et al.*, 1996, em hambúrgueres grelhados no carvão, pode dizer-se que o nível de formação de AAHs em carne é muito superior ao que se verifica no salmão e na sardinha, independentemente do método e condições de grelha. O nível de ingestão AAHs em 200 g de hambúrguer pode mesmo atingir os 78600 ng.

No que respeita à composição em AAHs, verifica-se, na maioria das amostras, uma predominância de AAHs térmicas em relação às pirolíticas (Figura 34). As Postas B de salmão, por exemplo, apresentam uma percentagem de amins térmicas que ultrapassa os 90%. Nas Postas A e C, de salmão, essa percentagem é superior a 60% e no caso das Sardinhas D é de

44%. Pelo contrário, nas Sardinhas B essa proporção inverte-se, uma vez que, quase 80% do teor total de AAHs correspondem às aminas pirolíticas. Sendo assim, a partir de determinado valor de temperatura e após um certo tempo de processamento, as aminas pirolíticas que, habitualmente existem em menores quantidades, podem tornar-se predominantes nos alimentos processados.

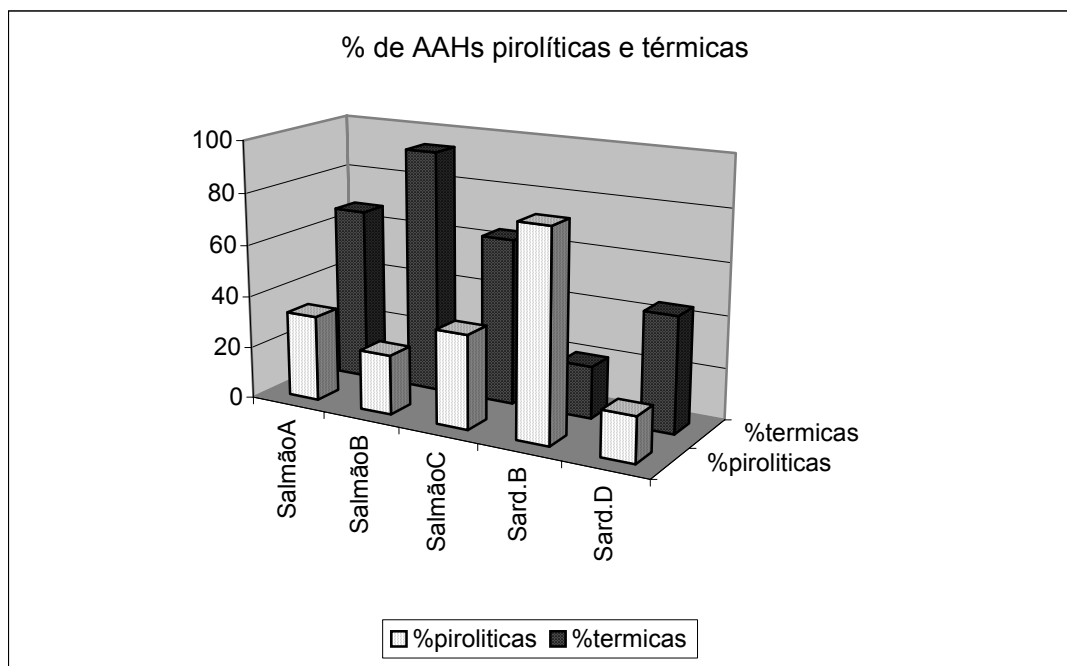


Figura 34. Percentagem de aminas pirolíticas e térmicas nas amostras de sardinha e salmão com níveis detectáveis de AAHs.

Adicionalmente, estudos recentes, sobre a carcinogenicidade de AAHs pirolíticas, enfatizam a necessidade de mais informação sobre a sua presença nos alimentos (Frederiksen, 2005), especialmente no caso de alimentos grelhados no carvão, onde facilmente se atingem temperaturas elevadas. Apesar de apresentarem um potencial mutagénico relativamente baixo, as α carbonilas revelaram um potencial carcinogénico de nível moderado a elevado, sendo responsáveis pela formação de uma grande quantidade de aductos no DNA das células hepáticas de ratos. Além disso, os mesmos estudos, demonstraram que as vias de destoxificação e excreção das α carbonilas têm pouca expressão, pelo que, uma elevada quantidade deste tipo de aminas é activada “*in vivo*”.

Estas aminas não podem, por isso, ser consideradas de somenos importância, relativamente às aminas térmicas, no que toca ao risco que

representam para a saúde humana: São, portanto, necessários mais estudos relacionados com o metabolismo, a bioactivação e a ingestão das aminas pirolíticas, nomeadamente, recorrendo ao desenvolvimento de biomarcadores humanos para estas aminas.

3. Conclusões

O método de processamento culinário e as condições de tempo e temperatura implicadas são, de facto, determinantes no aparecimento das AAHs nos alimentos proteicos. Este aspecto torna difícil a comparação de resultados obtidos entre diferentes autores, uma vez, que a temperatura e tempo de processamento nem sempre são referidos na bibliografia e na maioria dos casos são difíceis de controlar. No estudo realizado nas sardinhas grelhadas foi evidente a influência do tempo de grelha na formação de AAHs: nas sardinhas grelhadas durante 5 minutos (Sardinhas A) não se detectaram AAHs e ao fim de 7 minutos (Sardinhas B) já foi possível a detecção de vários tipos destas aminas. Em condições domésticas, os níveis de exposição a estas aminas, numa refeição de sardinhas grelhadas, depende de sobremaneira das preferências alimentares de cada indivíduo e do modo de preparação das mesmas: nas Sardinhas C não se detectaram aminas, enquanto que nas D foi possível detectar algumas AAHs em quantidades consideráveis, é de realçar que tanto as sardinhas C como as D tinham sido cozinhadas a um grau de cocção médio.

No estudo realizado com postas de salmão, pretendeu-se comparar dois tipos de grelha: a grelha a carvão e a grelha eléctrica. Na grelha a carvão estudou-se, também, a influência da distância à fonte de calor no teor final de AAHs. Da avaliação dos resultados obtidos, para cada uma das situações, pôde concluir-se que a temperatura e a proximidade à fonte de calor são factores determinantes na formação de AAHs, uma vez que, os níveis mais elevados de aminas são, de facto, os que se encontram para o salmão grelhado próximo do carvão (300°C). Na grelha eléctrica, apesar da

proximidade à fonte de calor, os níveis de AAHs não são tão elevados, uma vez que a temperatura de processamento é mais baixa (200°C). Além do factor temperatura, a utilização de carvão como fonte de calor pode estar na origem de níveis mais elevados destas amins. Não obstante, as diferenças entre a grelha eléctrica e a grelha afastada do carvão no que respeita ao teor de AAHs não são significativas.

As diferenças qualitativas de AAHs entre os dois peixes (salmão e sardinha) grelhados no carvão, deverão estar relacionadas com as suas diferentes composições em aminoácidos, creatina e proteínas (os principais precursores de AAHs). Lee e Tsai, 1991, atribuíam essas diferenças a componentes minoritários, uma vez, que consideravam não haver diferenças significativas entre as várias fontes proteicas, no que respeita à composição relativa em macronutrientes. No entanto Pais *et al.*, 1999, vieram contradizer esta ideia, uma vez que consideravam existir diferenças significativas na composição em aminoácidos entre os diferentes tipos de carne, o que nos leva a supor que essas diferenças poderão também existir entre os diferentes tipos de peixe. Assim sendo, podemos supor que a sardinha apresenta níveis maiores de glicina (percursora do MeIQx e MeIQ) que o salmão e que este, por sua vez, apresenta níveis mais elevados de fenilalanina (percursora do PhIP). Outras diferenças relativas ao teor em gorduras e em água podem estar na origem destes resultados. O salmão apresenta maiores teores em gordura e água que a sardinha (ver Tabelas 1 e 2).

Será ainda de referir que, ao contrário do que acontece nas sardinhas, das amins resultantes da pirólise do triptofano, apenas as α carbolinas são detectáveis no salmão. As AaC e MeAac existem em níveis apreciáveis, enquanto que as Trp-P-1 e Trp-P-2 não são de todo detectáveis. Torna-se difícil explicar este facto, pois os mecanismos de formação destas amins não estão perfeitamente conhecidos. Esta falta de conhecimento deve-se, mais uma vez, à baixa ocorrência deste tipo de amins nos alimentos cozinhados, em condições normais.

Os resultados obtidos para as diferentes amostras de sardinha e salmão demonstram que o nível de ingestão de AAHs no peixe grelhado pode ser muito variável, pois dependem, em grande medida, de factores comportamentais que variam com a preferência do consumidor: tipo de grelha,

tempo e proximidade à fonte de calor (temperatura) utilizados. Compreende-se, portanto, as dificuldades e limitações dos estudos epidemiológicos, pois estes devem reflectir não só diferenças culturais e gastronómicas entre diferentes grupos populacionais, mas também preferências e diferenças individuais.

Em comparação com a carne grelhada a carvão, a sardinha e salmão grelhados têm, de facto, teores mais baixos em AAHs. Este aspecto está relacionado com vários factores - maior teor em água e maior capacidade de retenção do tecido muscular dos peixes, elevado teor em poliinsaturados e menor quantidade de precursores em relação à carne. As escamas e “pele” do peixe também podem funcionar como uma camada protectora da formação de AAHs.

Apesar destas características benéficas do peixe, os níveis encontrados de aminas pirolíticas, principalmente de α carbolinas, foram surpreendentemente elevados, tendo-se verificado uma lacuna no que respeita ao interesse e estudo científico por este tipo particular de aminas. Sabe-se, no entanto, que as α carbolinas, assim como a PhIP, são as aminas que apresentam um potencial mutagénico mais baixo. Pelo contrário, as MeIQx, MeIQ, IQ e IQx são consideradas as mais mutagénicas, sendo também as mais abundantes nas carnes processadas. Pode dizer-se, então, que a sardinha e o salmão são opções saudáveis pela riqueza nutricional que apresentam, trata-se, apenas, de reconsiderar as formas de processamento dos mesmos e, principalmente, controlar factores como o tempo, temperatura e distância à fonte de calor. Assim sendo, grelhar pode ser um método culinário saudável, desde que se tenham em conta alguns cuidados, tais como, manter o alimento afastado da fonte de calor; utilizar aparelhos de grelha eléctricos que limitem a formação de substâncias tóxicas; cozinhar alimentos previamente partidos em pequenas porções, permitindo uma confecção mais rápida e a temperaturas mais baixas; eliminar a gordura dos alimentos antes de efectuar a grelha, evitando a carbonização do mesmo e reduzir o tempo de grelha, virando muitas vezes a face em contacto com a fonte de calor.

4. Bibliografia

Adamson, R.H., Thorgirsson, U.P. (1995) Carcinogens in foods: Heterocyclic Amines and cancer and heart disease *Adv. Exp. Med. Biol.* 211-220.

Augustsson, K, Skog, K, Jagustad, M., Dickman, P.W., Steineck G. (1999) Dietary heterocyclic amines and cancer of the colon, rectum, bladder and kidney: a population based study *Lancet* 353, 686-687.

Arthur, C.L., Pawlszyn, J. (1990) Solid-phase microextraction with thermal-desorption using fused-silica optical fibers *Anal. Chem.* 62, 2145-2148.

Balogh, Z., Gray, J.I., Gomaa, E.A., Booren, A.M. (2000) formation and inhibition of heterocyclic amines in fried ground beef patties *Food Chem. Toxicol.* 38, 395-401.

Barnes, W.S., Weisburger, J.H. (1983) Lipid content and mutagen formation in the cooking meat. *Proceedings of AACR:95*.

Bendaly, J., Zhao, S., Neale J.R., Metry, K.J., Doll, M.A., States, J.C., Pierce, W.M., Hein D.W. (2007) MeIQx-induced DNA adduct formation and mutagenesis in DNA repair deficient CHO cells expressing human CYP1A1 and rapid or slow acetylator NAT2. *Cancer Epidem. Biomar.* 16, 1503-1509.

Bethune, C., Seierstad, S.L., Seljeflot, I., Johansen, O., Arnesen, H., Meltzer, H.M., Rosenlund, G.; Froyland, L., Lundebye, A.K. (2006) Dietary intake of differently fed salmon: a preliminary study on contaminants. *Eur. Clin. Invest.* 36, 193-201.

Busquets, R., Bordas, M., Toribio, F., Puignou, L., Galceran, M.T. (2004) Occurrence of heterocyclic amines in several home-cooked meat dishes of the Spanish diet. *J. Chromatogr. B* 802, 79-86.

Cardenes, L., Ayala, H.J., Afonso, M. A., Gonzalez, V. (2004) Solid-phase microextraction coupled with high-performance liquid chromatography for the analyses of heterocyclic aromatic amines, *J. Chromatogr. A* 1030, 87-93.

Chawford, M.A. (1992) The role of dietary fatty acids in biology: Their place in the evolution of the human brain. *Nutr. Rev.* 50, 3-11.

Choi, M.H., Cech, J.J. (1998) Unexpectedly high mercury level in pelleted commercial fish feed. *Environ. Toxicol. Chem.* 17, 1979-1988.

Davis, C.D., Dacquel, E.J., Schut, H.A.J., Thorgeirson, S., Snyderwine, E.G. (1996) In vivo mutagenicity and DNA adducts levels of Heterocyclic Amines in MutaTM Mice and c-myc/lacZ double transgenic mice. *Mutat. Res.* 356, 287-296.

Desmond, E.M., Troy, D.J., Buckley, D.J. (1998) The effects of tapioca starch, oat fibre and whey protein on the physical and sensory properties of low-fat beefburgers. *Lebensm. Wiss. Technol.* 12, 214-224.

Dingley, K.H., Curtis, K.D., Nowell, S., Felton, J.S. (1999) DNA and Protein Adduct Formation in the Colon and Blood of Humans after Exposure to a Dietary-relevant dose of 2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine. *Cancer. Epidem. Biomar.* 8, 507-512.

Dyeberg, J., Bang, H.O., Stoffersen, E., Moncada, S.; Vane, J.R. (1981) Eicosapentaenoic acid and prevention of thrombosis and atherosclerosis. *Lancet* 2, 117-119.

Fang, M., Edwards, R.J., Bartlett-Jones, M., Taylor, G.W., Murray S., Boobis, A.R. (2004) Urinary N²-(2'-deoxyguanosin-8-yl)PhIP as a biomarker for PhIP exposure. *Carcinogenesis* 25,1053-1062.

Felton, J.S., Fultz, E., Dolbeare, F.A., Knize, M. G. (1994) Effect of microwaves on heterocyclic aromatic amine mutagens/carcinogens in fried beef patties. *Food Chem. Toxicol.* 32 (10), 897-903.

Felton, O., Levander, A., Rothman, N. (1998) Heterocyclic amine content of pork products cooked by different methods and to varying degrees of doneness. *Food Chem. Toxicol.* 36(4): 289-97 .

Frederiksen, H. (2005) Two food-borne heterocyclic amines: metabolism and DNA adduct formation of amino α carbolines. *Mol. Nutr. Food Res.* 49, 263-273.

Galceran, M.T., Moyano, E., Puignon, L., Pais, P. (1996) Determination of hydroxypolycyclic aromatic hydrocarbons by Liquid Chromatography-mass spectrometry comparison atmospheric pressure chemical ionization and electrospray *J. Chromatogr. A* 730, 185-194.

Gooderham, N. J., Murray, S., Lynch, A.M., Yadollahi-Farsani, M., Zhao, K., Boobis, A.R., Davies, D.S. (2001) Food derived heterocyclic amines mutagens: variable metabolism and significance to humans. *Drug metab. Dispos.* 29,529-534.

Goodnight, S.H.J., Harris, W.S., Connor, W.E., Allingworth, R.D. (1982) Polyunsaturated fatty acids, hyperlipidemia and thrombosis. *Arteriosclerosis* 2, 87-113.

Gross, G. (1990) Simple methods for quantifying mutagenic heterocyclic amines in foods. *Carcinogenesis* 11, 1597-1603

Gross, G., Gruter, A. (1992) Quantification of mutagenic/carcinogenic heterocyclic amines in food products. *J. Chromatogr. A* 592, 275-278.

Gross, G. A., R. J. Turesky, L. B. Fay, W. G. Stillwell, P. L. Skipper, Tannenbaum S.R. (1993) Heterocyclic aromatic amine formation in grilled bacon, beef and fish and in grill scrapings. *Carcinogenesis* 14, 2313-8

Guy, P.A., Gremaud, E., Richoz, J., Turesky, R.J. (2000) Quantitative analyses of mutagenic heterocyclic aromatic amines in cooked meat using Chromatography-atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 883, 89-102.

Hashimoto, Y., Shodo, K., Okamoto, T. (1980) Modification of nucleotide acids with mutagenic heteroaromatic amines in vivo. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 92, 971-976.

Herraiz, T. (2000) Tetrahydro beta-carboline-3-carboxylic acid compounds in fish and meat possible precursors of co-mutagenic beta carboniles Norharman and Harman in cooked food. *Food Addit. Contam.* 17, 859-66.

Hites, R.A., Foran, J.A., Shwager, S.J., Knuth, B.A., Hamilton, M.C., Carpenter, D.O. (2004) Global assessment of PBCs in farmed and wild salmon. *Environ. Sci. Technol.* 38, 4945-4949.

Instituto Dr. Ricardo Jorge – Tabela Composicional dos alimentos

Jägerstad, M., Skog, K., Grivas, S., Olsson, R. (1991) Formation of heterocyclic amines using model systems. *Mutat. Res.* 259, 219-233.

Jägerstad, M., Skog, K., Arvidsson, P., Solyakov, A. (1998) Chemistry, formation and occurrence of genotoxic heterocyclic amines identified in model systems and cooked foods. *Z. Lebensm Unters Forsch. A* 207, 419-427.

Johansson M.A., Fredholm, L., Bjerne, I., Jagerstad, M. (1995) Influence of frying fat on the formation of heterocyclic amines in fried beefburgers and pan residues. *Food Chem. Toxicol.* 33, 993-1004.

Karamanos, K.N., Tsegenidis, T. (1996) Analyses of carcinogenic heterocyclic amines by HPLC. *J. Liq. Chromatogr.* 19, 2247-2256.

Kasai, H., Yamaizumi, Z., Nishimura, S., Wakabayashi, K., Nagao, M., Sugimura, T., Singarn, E.N., Weisburger, J.H., Yokoyama, S., Miyazawa, T. (1981) A potent mutagen in broiled fish-2-Amino-3-methyl-3H-imidazo[4,5-f]quinoline. *Chem. Soc. Rev.* 1, 2290 – 2293.

Kataoka, H., Kijima, K., (1997) Analyses of Heterocyclic amines as their N-dimethylaminomethylene derivatives by Gas Chromatography with nitrogen phosphorous selective detection. *J. Chromatogr. A* 767,187-194.

Kataoka, H., Kijima, K., Maruo, G. (1998) Determination of Mutagenic Heterocyclic Amines in Combustion Smoke Samples. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 60, 60-67

Kataoka, H., Lord, H.L., Pawliszyn, J. (2000) Applications of solid phase microextraction in food analyses. *J. Chromatogr. A* 880, 35-62.

Keating, G. A., Layton D. W., Felton J. S (1999) Factors determining dietary intakes of heterocyclic amines in cooked foods. *Mutat. Res.* 443, 149-156.

Keating, G.A., Bogen, K.T. (2004) Estimates of heterocyclic amines intake in the U.S. population. *J. Chromatogr. B* 802,127-133.

Kim, D., Guengerich, P.F. (2005) Cytochrome P450 activation of arylamines and heterocyclic amines. *Annu. Rev. Pharmacol.* 45, 27-49.

Knize, M.G., Andresen, B., Healy, S., Schen, N.H., Lewis, P., Bjeldanes, L., Hatch, F., Felton, J. (1985) Effects of temperature, patty thickness and fat content on the production of mutagens in fried ground beef. *Food Chem. Toxicol.* 23, 1035-1040.

Knize, M.G., Dolbeare, F.A., Carroll, K.L. and Felton, J.S. (1994) Effect of cooking time and temperature on the heterocyclic amine content of fried-beef patties. *Food Chem. Toxicol.* 32, 595- 603.

Knize, M.G., Sinha, R., Rothman, n., Brown, E., Salmon, C., Levander, O., Cunningham, P., Felton, J. (1995) Heterocyclic amines content in fast food meat products. *Food Chem. Toxicol.* 33, 545-551.

Knize, M., G., Sinha, R., Salmon, C.P., Mehta, S.S., Dewhirst, K.P., Felton, J.S. (1996) Formation of heterocyclic amines mutagens/carcinogens

during home and commercial cooking of muscle foods. *J. Muscle Foods* 7, 271-279.

Layton, D. W., K. T. Bogen, M. G. Knize, F. T. Hatch, V. M. Johnson and J. S. Felton (1995) Cancer risk of heterocyclic amines in cooked foods: an analysis and implications for research. *Carcinogenesis* 16, 39-52.

Lee, H. Tsai, S.J. (1991) Detection of IQ-Type mutagens in canned posted eel. *Food Chem. Toxicol.* 29, 517-522.

Manabe, S., Uchida, E., Wada, O. (1989) Carcinogenic tryptophan pyrolysis products in airborne particles and rain water. *Mutat. Res.* 226, 215–221.

Manabe, S., Suzuki, H., Wada, O., Ueki, A. (1993) Detection of the carcinogen 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) in beer and wine. *Carcinogenesis* 14, 899-901.

Mendonsa, S.D., Hurtubise, R.J. (1999) Determination of ionization constants of heterocyclic aromatic amines using capillary zone electrophoresis. *J. Liq. Chromatogr. R. T.* 22, 1027.

Messner, C., Murkovic, M. (2004) Evaluation of a new model system for studying the formation of heterocyclic amines. *J. Chromatogr. B*, 802, 19-26.

Monti S.M., Ritieni A., Sacchi R., Skog K., Borgen E., Fogliano V. (2001) Characterization of phenolic compounds in virgin olive oil and their effect on the formation of carcinogenic/mutagenic heterocyclic amines in a model system. *J. Agri. Food Chem.* 49, 3969–3975.

Mozaffarian, D., Rim, B.E. (2006) Fish intake, contaminants and human health. *J.A.M.A.* 296, 1885-1899.

Murkovic, M., Steinberg, D., Pfannhauser, W. (1998) Antioxidant spices reduce the formation of heterocyclic aromatic amines in fried meat. *Z. Lebensm. Unters. Forsh. A* 207, 477-480.

Murkovic, M. (2004) Formation of Heterocyclic Aromatic Amines in model systems. *J. Chromatogr. B* 802, 3-10.

Nacional Cancer Institute DCCPS Surveillance Research Program Cancer Statistics Branch 2002 Surveillance, Epidemiology and End results (SEER) Program-Public –Use Data (1973-1999)

Nagao, M., Honda, Seyno, Y., Yahagi, T., Sugimura, T. (1977) Mutagenecities of protein pirolisates. *Cancer Lett.* 2, 335-339.

Nerurkar, P. V., Marchand, L., Cooney, R. V. (1999) Effects of marinating with Asian marinades or western barbecue sauce on PhIP and MeIQx formation in barbecued beef. *Nutr. Cancer* 34,147-52.

Nunes, C.S., Baptista, A.O. (2001) Implicações de reacções Maillard nos alimentos e nos sistemas biológicos. *Rev. Port. Cien. Vet.* 96, 53-59.

Oguri, A., Suda, M., Totsuka, Y., Sugimura, T., Wakabayashi, K. (1998) Inhibitory effects of antioxidants on formation of heterocyclic amines. *Mutat. Res.* 402, 237-245.

Olsson, J.C., Dyrmark, A., Karlberg, B. (1997) Determination of twenty eight heterocyclic amines and aminoacids during wine aging by electrokinetic chromatography with amperometric detection. *J. Chromatogr. A* 765, 329-335.

Olsson, V., Skog, K., Lundstrom, K., Jagerstad, M. (2005) Colour photographs for estimation of heterocyclic amines intake from fried pork chops of different RN genotypes indicate large variations. *Food Qual. Prefer.* 16, 91-101.

Oz, F., Kaban, G., Kaya, M. (2007) Effects of cooking methods on the formation of heterocyclic amines of two different species trout. *Food Chem.* 104, 67-72.

Pais, P., Salmon, C.P., Knize, M.G., Felton, J.S. (1999) Formation of the IFP in Model Systems, Meats and Meats Drippings. *J. Agric. Food Chem.* 47, 1098-1108.

Pais, P., Tanga, M.J., Salmon, P., Knize, M.G. (2000) Formation of the IFP in Model Systems and Detection in Restaurant Meats. *J. Agri. Food Chem.* 48,1721-1726.

Pawliszyn, J. (1997) Solid phase microextraction: Theory and Practice, Wiley-VCH, New York.

Persson, E., Sjöholm, I., Skog, K. (2002) Heat and mass transfer in chicken breasts, effect on PhIP formation. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 214, 455-459.

Persson, E., Graziani, G., Ferracane, R., Fogliano, V., Skog, K. (2003) Influence of antioxidants in virgin oil on the formation of heterocyclic amines in fried beefburgers. *Food Chem. Toxicol.* 41, 1587-1597.

Puignou, L., Casal, J., Santos, F.J., Galceran, M.T. (1997) Determination of heterocyclic amines by capillary-zone electrophoresis in a meat extract. *J. Chromatogr. A* 769, 293.

Quach, M.L., Chen, X. D., Stevenson, R.J. (1999) Headspace sampling of whey protein concentrate solutions using solid-phase microextraction. *Food Res. Int.* 31, 371-379.

Reistad, R., Rossland, O.J., Latva-Kala, K.J., Rasmussen, T., Vikse, R., Becher, G., Alexander, J. (1997) Heterocyclic aromatic amines in human urine following a fried meat meal. *Food Chem. Toxicol.* 35, 945-955.

Reistad, R., Nyholm, S.H., Haug, L.S., Becher, G. (1999) PhIP in human hair as biomarker for dietary exposure. *Biomarkers* 4, 263-271.

Roberts-Thomson, I.C., Butler, W.J., Ryan, P. (1999) Meat. Metabolic genotype and risk of colorectal cancer, *Eur. J. Cancer* 8, 207-211.

Salmon, C.P., Knize, M.G., Felton, J. (1997) Effects of marinating on heterocyclic amine carcinogenic formation in grilled chicken. *Food Chem. Toxicol.* 35 433-441.

Salmon, C.P., Knize, M.G., Felton, J.S., Zhao, B., Seow, A. (2005) Heterocyclic aromatic amines in domestically prepared chicken and fish from Singapore Chinese households. *Food Chem. Toxicol.* 44, 484-492.

Santos, E.C.O., Camara, V.M., Jesus, I.M., Brado, E.S., Loureiro, E.C.B., Mascarenhas, A.F.S., Fayal, K.F., Sá-Filho, G.C., Sagica, F.E.S, Lima, M.O., Higushi, H., Silveira, I.M. (2002) Contribution to the establishment of reference values for total mercury levels in hair and fish in Amazonia. *Environ. Res.* 90, 6–11.

Schmidt, G.R. (1988) Processing. In: Meat Science, Milk, Science and Technology (Cross HR, Overby. AJ, eds). Amsterdam: Elsevier Science Publishers B.V.

Sinha, R., Rothman, N., Salmon, C.P., Knize, M.G., Brown, E.D., Swanson, C.A., Rhodes, D.R., Rossi, S., Felton, J.S., Levander, O.A. (1995) High concentrations of the carcinogen 2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo-[4,5-b]pyridine (PhIP) occur in chicken but are dependent on the cooking method. *Cancer Res.* 55, 4516-4519.

Sinha, R., Rothman, N., Salmon, C.P., Knize, M.G., Brown, E.D., Swanson, C.A., Rhodes, D.R., Rossi, S., Felton, J.S., Levander, O.A. (1998)

Heterocyclic aromatic amines content of pork products by different methods and to varying degrees of doneness and made from meat droppings. *Food Chem. Toxicol.* 36, 279-287.

Sinha, R. (2002) An epidemiologic approach to studying heterocyclic amines. *Mutat. Res.* 506-507, 197-204.

Skog, K. I. (1993) Cooking procedures and food mutagens: a literature review. *Food Chem. Toxicol.* 31, 655-675.

Skog, K.I., Steineck, G., Augustsson, K., Jagerstad, M.I. (1995) Effect of cooking temperature on the formation of heterocyclic amines in fried meat products and pan residues. *Carcinogenesis* 16, 861-867.

Skog, K.I., Augustsson, K., Steineck, G., Stenberg, M., Jagerstad, M. I. (1997) Polar and Non-polar Heterocyclic Amines in Cooked Fish and Meat Products and their Corresponding Pan Residues. *Food Chem. Toxicol.* 35, 555-565.

Skog, K.I., Johansson, M.A.E., Jagerstad, M.I. (1998) Carcinogenic Heterocyclic Amines in Model Systems and cooked food: a review on formation, occurrence and intake. *Food Chem. Toxicol.* 36, 879-896.

Snyderwine, E.G., Yamashita, K., Adamson, R.H., Sato, S., Nagao, M., Sugimura, T., Thorgeirsson, S.S. (1988) Use of the ³²P-postlabeling method to detect DNA adducts of 2-amino-3-methylimidazo[4,5-*f*]quinoline (IQ) in monkeys fed IQ: identification of the *N*-(deoxyguanosin-8-yl)-IQ adduct. *Carcinogenesis* 9, 1739–1743.

Snyderwine, E.G., Adamson, R.H., Welti, D.H., Richli, U., Thorgeirsson, S.S., Wurznier, H.P., Turesky, R.J. (1991) Metabolism of 2-amino-3-methylimidazo[4,5-*f*]quinoline (IQ) in the monkey *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.* 32, 121.

Snyderwine, E.G. (1994) Some perspectives on the nutritional aspects on breast cancer research. Food-derived heterocyclic amines of etiologic agents in mammary cancer. *Cancer* 74, 1070-1077.

Snyderwine, E.G., Turesky R.J., Turteltaub, L.D., Sadrieh, N., Schut, H.A., Nagao, M., Sugimura, T., Thorgeirsson, U.P., Adamson, R.H., Thorgeirsson, S.S. (1997) Metabolism of 4,5-*f* heterocyclic amines in non-human primates. *Mutat. Res.* 376,203-210.

Solomon, M.S., Morgenthaler, P.M.L., Turesky, R.J., Essigman, J.M. (1996) Mutational and DNA binding specificity of the carcinogen 2-amino-3, 8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline. *J. Biol. Chem.* 271, 18368-74.

Sugimura T. , Sato S. (1983) Mutagens-Carcinogens in foods. *Cancer Res.* 43, 2415S-2421S

Sugimura, T., Wakabayashi, K. (1990) Mutagens and carcinogens in food. *Mutag. Carcinog.*,1-18.

Sugimura T. (1990) "Mutagens and carcinogens formed by cooking meat and fish: heterocyclic amines." In: Finot PA, et al. (eds.) *The Maillard Reaction in Food Processing, Human Nutrition and Physiology*. Basel; Boston: Birkhäuser Verlag. 323-334

Sugimura, T. (1995) Heterocyclic amines in cooked foods: possible human carcinogens. *Princeton Sci. Rev.* 214-231.

Sugimura, T. (2000) Nutrition and dietary carcinogens. *Carcinogenesis* 211, 387-395.

Takahashi, M., Wakabayashi, K., Nagao, M., Yamamoto, M., Masui, T., Goto, N., Kinae, N., Tomita, I, Sugimura, T (1985) Quantification of 2-amino-3-methylimidazo[4, 5-f]quinoline (IQ) and 2-amino-3, 8-dimethylimidazo[4, 5-f]quinoxaline (MeIQx) in beef extracts by liquid chromatography with electrochemical detection (LCEC). *Carcinogenesis* 1195-99.

Thompson, L.H., Tucker, J.D., Stewart, S.A., Christensen, M.L., Salazar, E.P., Carrano, A.V. and Felton, J.S. (1987) Genotoxicity of compounds from cooked beef in repair-deficient CHO cells versus *salmonella* mutagenicity. *Mutagenesis* 2, 483-487.

Toribio, F., Galaran, M.T., Moyano, E., Puignou L. (1999) Evaluation of different clean up procedures for the analyses of heterocyclic amines in a liophylised meat extract. *J. Chromatogr. A* 836, 223-233

Toribio, F., Galceran, M.T., Moyano, E., Puignou L. (2000a) Separation of heteroaromatic amines in food products. *J. Chromatogr. B*, 747, 171-202.

Toribio, F., Galceran, M.T., Moyano, E., Puignou L. (2000b) Comparison of different commercial solid-phase extraction cartridges used to extract heterocyclic amines from liophylised meat extract. *J. Chromatogr. A* 880, 101-112.

- Toribio, F., Busquets, R., Puignou, L., Galceran, M. T. (2007) Heterocyclic amines in griddled beef steak analysed using a single extract clean-up procedure. *Food Chem. Toxicol.* 45, 667-675.
- Vanderlaan, M., Watkins, B.E., Hwan, M., Knize, M.G., Felton, J.S. (1988) Monoclonal antibodies for the immunoassay of mutagenic compounds produced by cooking beef. *Carcinogenesis* 9, 153-160.
- Vanderlaan, M., Watkins, B.E., Hwan, M., Knize, M.G., Felton, J.S. (1989) Monoclonal antibodies to amino-1-methyl-6-phenylimidazo(4,5-b)pyridine and their use on the analyses of well done fried beef. *Carcinogenesis* 10, 2215-2221.
- Vitaglione, P., Fogliano, V. (2004) Use of antioxidants to minimize the human health risk associated to mutagenic/carcinogenic heterocyclic amines in food. *J. Chromatogr. B* 802, 189-199.
- Wakabayashi, K., Ushiyama, H., Takahashi, M., Nukaya, H., Kim, S.B., Hirose, M. (1993) Exposure to heterocyclic amines. *Environ. Health Persp.* 99, 129-133.
- Wu, R.W., Wu, E.M., Thompson, L.H., Felton, J.S. (1995) Identification of aprt gene mutations induced in repair-deficient and P450-expressing CHO cells by the food-related mutagen/carcinogen, PhIP. *Carcinogenesis* 16, 1207-1213.
- Wu, J., Wong, M. K., Lee, J.K., Ong, C. N. (1995) Capillary zone electrophoretic determination of heterocyclic aromatic amines in rain. *J. Chromatogr. A* 33, 712-716.
- Yamaizumi, Z., Shiomi, T., Kasai, H., Nishimura, S., Takahashi, Y., Nagao, M., Sugimura, T. (1980) Detection of potent mutagens, Trp-P-1 and Trp-P-2, in broiled fish. *Cancer Lett.* 9, 75-83.
- Yamaizumi, Z., Kasai, H., Nishimura, S., Edmonds, C.G., McCloskey, J.A. (1986) Stable isotope dilution quantification of mutagens in cooked foods by combined Liquid Chromatography Thermospray Mass Spectrometry. *Mutat. Res.* 173, 1-7.
- Zhao, Y.I., Schelfaut, M., Sandra, P., Banks, F. (1998) Hiphenation and detection system capillary electrophoresis and capillary electrophoresis-electrospray-mass spectroscopy for the analyses of heterocyclic amines. *Electrophoresis* 19, 2213-19.

Zochling, S., Murkovic, M. (2002) Formation of the heterocyclic aromatic amine PhIP: identification of precursors and intermediates. *Food Chem.* 79, 125-134.

http://www.fao.org/documents/advanced_s_result.asp?QueryString=fish+consumption_ (data de acesso 08/2008)

http://www.ine.pt/xportal/xmain?xpid=INE&xpgid=ine_publicacoes (data de acesso 09/2008)

http://www.eafpa.net/site/static/GB/index.php__ (data de acesso 08/2008)